

**UNIVERSIDAD FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR**

VÍCTOR JESÚS HUARINGA PAYANO

**ESTUDO DOS COMPONENTES DO SISTEMA ATIVINA-INIBINA-  
FOLISTATINA NA PROGRESSÃO DO CARCINOMA CERVICAL ESCAMOSO**

Belo Horizonte

2022

VÍCTOR JESÚS HUARINGA PAYANO

**ESTUDO DOS COMPONENTES DO SISTEMA ATIVINA-INIBINA-  
FOLISTATINA NA PROGRESSÃO 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 Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Enrrico Bloise

Coorientador(a): Profa. Dra. Annamaria Ravara Vago

Belo Horizonte

2022

043

Payano, Víctor Jesús Huaranga.

Estudo dos componentes do sistema ativina-inibina-folistatina na progressão do carcinoma cervical escamoso [manuscrito] / Víctor Jesús Huaranga Payano. – 2022.

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

Orientador: Prof. Dr. Enrrico Bloise. Coorientador(a): Profa. Dra. 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. Neoplasia Intraepitelial Cervical. 3. Papillomaviridae. 4. Ativinas 5. Inibinas. 6. Folistatina. 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 VICTOR JESUS HUARINGA PAYANO

Às **treze horas e trinta minutos** do dia **30 de agosto de 2022**, 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: "**ESTUDO DOS COMPONENTES DO SISTEMA ATIVINA-INIBINA-FOLISTATINA NA PROGRESSÃO DO CARCINOMA CERVICAL ESCAMOSO**", requisito final para obtenção do grau de Doutor 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 ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Enrrico Bloise	UFMG	
Dra. Annamaria Ravara Vago	UFMG	
Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida	UFMG	
Dra. Marcia Cristina França Ferreira	UFMG	
Dra. Jaquelline Germano de Oliveira	Instituto Oswaldo Cruz - MG	
Dra. Renata Toscano Simões	Faculdade Santa Casa- BH	

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato 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, 30 de agosto de 2022.**

Dr. Enrrico Bloise (Orientador)

Dr<sup>a</sup>. Annamaria Ravara Vago (Co-orientadora)

Dr<sup>a</sup>. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida

Dr<sup>a</sup>. Marcia Cristina França Ferreira

Dr<sup>a</sup>. Jaquelline Germano de Oliveira

Dr<sup>a</sup>. Renata Toscano Simões

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



Documento assinado eletronicamente por **Marcia Cristina Franca Ferreira, Professora do Magistério Superior**, em 22/09/2022, às 12:01, 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 **Renata Toscano Simões, Usuário Externo**, em 22/09/2022, às 12:16, 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 **Jaquelline Germano de Oliveira, Usuário Externo**, em 22/09/2022, às 12:27, 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 **Enrrico Bloise, Professor do Magistério Superior**, em 22/09/2022, às 13:33, 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 22/09/2022, às 18:42, 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, Coordenador(a)**, em 23/09/2022, às 09:12, 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?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 **1779548** e o código CRC **8E0CA3D7**.

## Dedicatória

*Marina, Víctor, Sulma, Luciano, Jesús,  
amigas, amigos y todos los que me  
acompañaron y apoyaron durante este tiempo,  
sunquypim apaykichis.*

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador Enrrico Bloise e minha co-orientadora Annamaria Ravara Vago pela paciência, amizade e por me permitir trabalhar com vocês, sempre grato.

As minhas colegas do Laboratório de Patogênese Molecular: Keila, Larissa, Lara, Lilian, muito obrigado pelas dicas, ensinamentos e amizade brindada durante a etapa do doutorado.

Ao Dr. Alexandre Tafuri e equipe do Laboratório de Anatomia Patológica por nos ceder as amostras utilizadas neste estudo.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Instituto de Biologia Celular da UFMG, assim como aos professores e colegas, aprendi muito de todos.

Às pacientes que permitiram a utilização das amostras para realizar esta pesquisa.

Aos professores que aceitaram gentilmente em participar da minha banca de Qualificação e Doutorado

Às agências de fomento que permitiram eu estar realizando este trabalho: CNPq, CAPES, FAPEMIG, PAEC OEA-GCUB, PROq-UFMG.

A todos os que contribuíram direta e indiretamente e não consigo mencionar, fico agradecido por tudo.

En especial a Oscar Gómez Jesús, gracias por tener buenos libros.

Gracias a ti que también estás leyendo este trabajo.

## RESUMO

O sistema ativina-inibina-folistatina regula proliferação, diferenciação e tumorigênese celular. Os componentes deste sistema são expressos no câncer cervical, sendo este associado à infecção pelo papilomavírus humano (HPV). A nossa hipótese é de que a expressão da subunidade  $\beta$ A-ativina/inibina e a da folistatina (FST) varia em lesões cervicais pré-neoplásicas e neoplásicas. Portanto, foi avaliada a imunolocalização celular da subunidade  $\beta$ A-ativina/inibina e da FST em biopsias cervicais de diferentes estágios de desenvolvimento neoplásico, e a associação desses resultados com a infecção pelo HPV. Neste estudo retrospectivo, tecidos cervicais incluídos em parafina obtidos de 162 pacientes foram diagnosticados por histopatologia em controle (n=15), neoplasia intraepitelial cervical (NIC) grau 1 (n=38), NIC2 (n=37), NIC3 (n=39) e carcinoma cervical escamoso (CCE n=33), e processados por imunohistoquímica para detecção da expressão da subunidade  $\beta$ A-ativina/inibina e FST. Um escore de imunomarcagem (IRS) semiquantitativo foi empregado para comparação da área tecidual marcada, entre os grupos. A detecção e genotipagem do HPV foram realizadas por PCR. Um total de 59% (n=88) das amostras cervicais foram positivas para o DNA-HPV. O tipo de HPV de alto risco mais detectado foi o HPV16 (54%; n=44), seguido pelo HPV18 (21%; n=17). A idade das pacientes e a presença do HPV16 foram maiores em CCE vs Controle. A subunidade  $\beta$ A-ativina/inibina e a FST foram localizadas no núcleo e citoplasma de todas as amostras. Os IRS citoplasmáticos da subunidade  $\beta$ A-ativina/inibina e da FST foram maiores que o IRS nuclear em todas as camadas do epitélio cervical nos grupos NIC1, NIC2, NIC3 e CCE. Uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) no escore citoplasmático e nuclear da subunidade  $\beta$ A-ativina/inibina foi verificada em todas as camadas epiteliais cervicais de NIC1, NIC2, NIC3 e CCE, comparado ao grupo controle. O escore nuclear da FST apresentou redução significativa ( $p < 0,05$ ) em camadas epiteliais específicas de NIC1, NIC2, NIC3 e CCE comparado ao Controle. A diminuição do IRS da subunidade  $\beta$ A-ativina/inibina e FST nos estratos do epitélio cervical em estágios específicos das NICs sugere que o sistema ativina-inibina-folistatina participa da perda do controle da proliferação de células cervicais pré-neoplásicas e neoplásicas. É importante ressaltar que essa diminuição pode estar relacionada à persistência da infecção por HPV16.

**Palavras-chave:**  $\beta$ A-ativina/inibina; folistatina, NIC; CCE; HPV.



## ABSTRACT

Cervical cancer (CC) associated with human papillomavirus (HPV) infection is the fourth most common type of cancer in women. The activin-inhibin-follistatin system regulates several cellular processes including proliferation, differentiation and tumorigenesis. We hypothesized that  $\beta$ A-activin/inhibin subunit and follistatin immunostaining vary in a cell type-dependent manner in pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions. Therefore, we evaluated the immunolocalization of the  $\beta$ A-activin/inhibin subunit and follistatin in tissues corresponding to different stages of cervical neoplasia, and associated the resulting immunolabeling data with HPV infection. In this retrospective study, cervical paraffin-embedded tissues from 162 patients sorted in control (n=15), cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade 1 (n=38), CIN2 (n=37), CIN3 (n=39) and Squamous cell carcinoma (SCC; n=33) groups were examined for  $\beta$ A-activin/inhibin subunit and follistatin immunolocalization. A semiquantitative immunoreactive score (IRS) was employed to compare the stained area among groups. HPV detection and genotyping were performed by PCR. Fifty-nine % (n=88) of all cervical specimens were HPV+. The most detected high-risk (HR)-HPV type was HPV16 (54%; n=44) followed by HPV18 (21%; n=17.4). Patient age and HPV16 genotyping were higher in SCC vs Control.  $\beta$ A-activin/inhibin subunit and follistatin were localized in the nucleus and cytoplasm of all sample tissues. Cytoplasmatic IRS of  $\beta$ A-activin/inhibin subunit and follistatin was higher than nuclear IRS in all cervical epithelium layers of CIN1, CIN2, CIN3 and SCC groups. A significant decrease ( $P<0.05$ ) in cytoplasmic and nuclear IRS of  $\beta$ A-activin/inhibin subunit was detected in all cervical epithelial layers from Control to CIN1, CIN2, CIN3 and SCC groups. Only nuclear follistatin IRS exhibited significant reduction ( $P<0.05$ ) in specific epithelial layers of cervical tissues from CIN1, CIN2, CIN3 and SCC, in comparison to tissues from Control group. Decreased  $\beta$ A-activin/inhibin subunit and follistatin IRS in cervical epithelium layers at specific stages of CIN progression suggests that the activin-inhibin-follistatin system participates in the loss of differentiation and proliferative control of pre-neoplastic and neoplastic cervical cells. Importantly, this decrease may be related to the persistence of HR-HPV infection during the progression from cervical pre-neoplastic lesions to SCC.

**Keywords:**  $\beta$ A-activin/inhibin; follistatin; CIN; SCC; HPV.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do vírus HPV.	19
Figura 2. Estrutura do genoma do HPV 16.	20
Figura 3. Ciclo de vida de HPV no Colo do Útero.	27
Figura 4. Alteração das funções das proteínas P53 e pRb.	30
Figura 5. Composição das unidades de Ativina e Inibina.	33
Figura 6. Sinalização e inativação celular de Ativina A.	35
Figura 7. Cortes histológicos das amostras dos grupos controle, neoplasia intraepitelial cervical de grau (NIC) 1, 2 e 3 e câncer do colo do útero corados com hematoxilina-eosina (H&E).	56
Figura 8. Imagem do gel de poliacrilamida a 6% corado pelo nitrato de prata, e apresentando o amplicon de 110 pb do gene de $\beta$ -globina humano obtido pela utilização de amostras cervicais.	57
Figura 9. Imagem do gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata, apresentando o amplicon de 150 pb do gene L1 a partir de amostras cervicais.	58
Figura 10. Gel de Poliacrilamida a 6% corado pelo Nitrato de Prata, representativo da amplificação dos fragmentos virais dos HPV's 16, 18, 31, 33, 35, 52 e 58, amplificados a partir de amostras cervicais positivas para cada tipo.	60
Figura 11. Expressão da subunidade $\beta$ A nas amostras de colo de útero nos grupos controle, Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) de grau 1, 2 e 3 e carcinoma cervical escamoso (CCE).	63
Figura 12. Escores de imunomarcção da subunidade ativina/inibina $\beta$ A em núcleo e citoplasma nas distintas camadas do epitélio do colo do útero em diferentes etapas da progressão do câncer do colo de útero.	64
Figura 13. Expressão da Folistatina (FST) nas amostras de colo de útero nos grupos controle, NIC 1, 2 e 3 e CCE.	66

Figura 14. Escores de imunomarcção de folistatina em núcleo e citoplasma nas distintas camadas do epitélio do colo do útero em diferentes etapas da progressão do câncer do colo de útero. 67

Figura 15. Comparação dos escores de imunomarcção de subunidade  $\beta$ A e folistatina de núcleo e citoplasma em grupos HPV positivos e HPV negativos nas diferentes etapas da progressão do câncer do colo do útero. 68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados para detecção do DNA do HPV e tipagem dos HPVs 16,18, 31, 33, 35 e 52.	50
Tabela 2. Escore de Imunorreatividade da marcação pelos anticorpos primários em amostras cervicais.	53
Tabela 3. Mediana $\pm$ SD, mínima e máxima das idades das pacientes das quais foram obtidas as amostras de colo do útero nos diferentes grupos analisados.	54
Tabela 4. Distribuição da faixa etária das pacientes das quais foram obtidas as amostras de colo do útero analisadas.	54
Tabela 5. Distribuição do tipo de lesão reportada no informe clínico prévio a análise histopatológica das amostras do colo do útero.	55
Tabela 6. Detecção do DNA do HPV por <i>Nested-PCR</i> nas amostras de tecido cervical.	59
Tabela 7. Genotipagem das amostras de tecido cervical positivo para DNA-HPV pelas técnicas de <i>Hemi-Nested PCR</i> e PCR convencional.	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

AHR	<i>Airway Hiperreactivity</i> (Hiper-reatividade das Vias Aéreas)
CCE	Carcinoma de células escamosas
Cdk2	<i>Cyclin Dependent Kinase 2</i> (Quinase Dependente de Ciclina 2)
CPN	Complexo do Poro Nuclear
cIAP2	<i>Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 2</i> (Inibidor Celular da Proteína de Apoptose 2)
DAB	Diamino - Benzidina 3,3
DMO	Distúrbio do Metabolismo Mineral e Ósseo
Dyn	Dyneine (Dineína)
DYNLT1	<i>Dynein light-chain 1</i> (Cadeia Leve de Dineína 1)
DYNLT3	<i>Dynein light-chain 3</i> (Cadeia Leve de Dineína 3)
SLN	Sinal de Localização Nuclear
E	<i>Early region</i> (Região Precoce)
E2F	Fator de Transcrição <i>E2</i>
E6AP	<i>E6-Associated Protein</i> (Proteína Associada a E6 )
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Epidérmico )
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (Receptor do Fator do Crescimento Epidérmico)
EMT	<i>Epithelial Mesenchymal Transition</i> (Transição Epitélio - Mesenquimal )
EN	Envoltório Nuclear
ERK	<i>Extracellular signal - Regulated Kinase</i> (Proteína kinase regulada por sinal Extracelular )
FLRG	<i>Foliatine-Related Gene</i> (Foliatina Relacionada ao Gene )
FSRP	<i>FST-Related Protein</i> (Proteína Relacionada à Foliatina)

FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i> (Hormônio Folículo Estimulante )
FST	Folistatina
FSTL3	<i>FST-like 3</i> (Folistatina tipo 3 )
HPV	Human Papillomavirus (Papilomavírus Humano )
HS	<i>Heparan sulfate</i> (Sulfato de Heparan )
HSC70	<i>Heat Shock Cognate/Protein of 71 kDa</i> (Proteína de Choque Térmico )
IFNs	Interferons
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRC	Insuficiência Renal Crônica
JEC	Junção Escamo-Colunar
JNK	<i>JUN N-terminal kinase</i> (Proteína kinase da porção N-terminal de JUN )
L	<i>Late region</i> (Região Tardia)
LCR	<i>Long Control Region</i> (Região Reguladora Longa )
LIEB	Lesões Intra-epiteliais Escamosas de Baixo-grau
LIEA	Lesões Intra-epiteliais Escamosas de Alto-grau
LRA	Lesão Renal Aguda
N:C	Núcleo:Citoplasma
NF-kB	<i>Nuclear Factor-kappa B</i> (Factor Nuclear kappa B)
NIC	Neoplasia Intra-epitelial cervical
NIC1	Neoplasia Intra-epitelial cervical de grau 1
NIC2	Neoplasia Intra-epitelial cervical de grau 2
NIC3	Neoplasia Intra-epitelial cervical de grau 3
NK	<i>Natural Killer</i> (Células Exterminadoras Naturais )
OMS	Organização Mundial da Saúde

ORFs	<i>Open Reading Frames</i> (Janelas Abertas de Leitura )
ORI	Origem de Replicação
p38 MAPK	p38 <i>Mitogen-activated Protein Kinase</i> (Proteína kinase ativada por Mitógeno)
p130	<i>Retinoblastoma-Like protein2</i> (Proteína tipo Retinoblastoma 2 )
p107	<i>Retinoblastoma-Like protein1</i> (Proteína tipo Retinoblastoma 1)
PDZ	<b>P</b> Post-synaptic density 95 - <b>PSD-85</b> ; <b>D</b> Discs large - <b>Dlg</b> ; <b>Z</b> Zonula occludens-1 - <b>ZO-1</b> (Domínio PDZ).
pRb	Proteína do Supressor do Tumor Retinoblastoma
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor</i> $\beta$ (Fator de Crescimento Transformante $\beta$ )
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i> (Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ )
vDNA	<i>viral DNA</i> (DNA viral)

## SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA .....	17
1.1 CÂNCER DO COLO DO ÚTERO .....	17
1.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) .....	17
1.2.1 O genoma do HPV .....	18
Região precoce (Early Region – E) .....	20
Região tardia (Late Region– L) .....	24
Região reguladora longa (Long Control Region – LCR) .....	25
1.2.2 Classificação do HPV .....	26
1.2.3 Ciclo de vida do HPV .....	26
1.2.4 Integração do genoma viral .....	28
1.3 LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS DO CÂNCER DO COLO DE ÚTERO .....	30
1.4 HPV: RESPOSTA IMUNE E CITOCINAS ENVOLVIDAS NA INFECÇÃO PELO HPV .....	32
1.5 ATIVINAS .....	33
1.6 INIBINAS .....	36
1.7 FOLISTATINA .....	37
1.8 AÇÃO DAS ATIVINAS NA INFECÇÃO E NA INFLAMAÇÃO .....	38
1.9 AS ATIVINAS E O CÂNCER .....	41
1.10 O SISTEMA ATIVINA-INIBINA-FOLISTATINA NO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO .....	43
2. JUSTIFICATIVA .....	44
3. OBJETIVOS .....	45
3.1 OBJETIVO GERAL: .....	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	46
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	46
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA .....	47
4.3 DETECÇÃO DA INFECÇÃO PELO HPV .....	48
4.4 GENOTIPAGEM DOS TIPOS DE HPV DE ALTO RISCO .....	49
4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA DE COMPONENTES DO SISTEMA ATIVINA-FOLISTATINA. ....	51
4.5.1 Incubação com os anticorpos primários .....	51
4.6 ANÁLISE DA IMUNOMARCAÇÃO .....	52



4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	53
5. RESULTADOS .....	54
5.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DAS PACIENTES INCLUÍDAS NO ESTUDO .....	54
5.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	55
5.3 VERIFICAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA EXTRAÍDO DAS AMOSTRAS CERVICAIS .....	57
5.4 DETECÇÃO DO DNA VIRAL DO HPV .....	58
5.5 DETECÇÃO DE GENÓTIPOS DO HPV .....	59
5.6 EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO DA SUBUNIDADE BÀ ATIVINA/INIBINA E FOLISTATINA EM DESORDENS PROLIFERATIVAS DO COLO UTERINO HUMANO. ....	61
6. DISCUSSÃO .....	69
7. CONCLUSÕES .....	76
8. REFERÊNCIAS .....	77

## 1. Revisão da Literatura

### 1.1 Câncer do Colo do Útero

O Carcinoma Cervical Escamoso (CCE) é o quarto tipo de câncer mais frequente em mulheres ao redor do mundo (Organização Mundial da Saúde, 2018), Ocorrendo principalmente em países com baixo nível de desenvolvimento sócio econômico (la Garza-Salazar, de *et al.*, 2017; Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA, 2019). É um tipo de câncer que pode ser evitado, e em países que possuem programas consolidados de prevenção e controle, observou-se diminuição nas taxas de incidência e de mortalidade em até 75% (Zheng *et al.*, 2019).

No Brasil este câncer é o terceiro tipo mais frequente, com 16.590 novos casos por ano e uma mortalidade de 6,2% do total dos casos de câncer estimados (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA, 2019). A incidência do câncer do colo do útero no Brasil é maior nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA, 2017).

Segundo a OMS, o câncer do colo do útero é classificado em duas categorias, o carcinoma de células escamosas (CCE) e o adenocarcinoma (Jiménez-Wences *et al.*, 2014). O CCE corresponde à grande maioria dos casos, e são originados de neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) não invasoras, que podem ser detectadas por exame citológico ou histopatológico (Solomon, 2002; National Institute of Health - NIH, 2017).

### 1.2 Papilomavírus Humano (HPV)

O desenvolvimento do CCE está fortemente associado à infecção pelo HPV, cuja transmissão ocorre principalmente por via sexual (Crosbie *et al.*, 2013; Groves & Coleman, 2015). Tal infecção é considerada um “pré-requisito” para o surgimento das lesões, mas, por si só não seria suficiente para o desenvolvimento do câncer do colo do útero (Zheng *et al.*, 2019), sendo necessária a contribuição de fatores relacionados ao hospedeiro (endógenos e exógenos), assim como de fatores relacionados ao vírus (Chelimo *et al.*, 2013; Groves & Coleman, 2015; Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA, 2018).

Dentre os fatores endógenos relacionados ao hospedeiro figuram: fatores genéticos, status funcional do sistema imune, maior acessibilidade e susceptibilidade das células metaplásicas da junção escamo-colunar (JEC) do colo uterino à infecção pelo HPV, diversidade da microbiota cérvico-vaginal e o histórico familiar (Gadelha *et al.*, 2017; Shannon *et al.*, 2017; Harden & Munger, 2017; Tommasino *et al.*, 2011; Burd & Dean, 2016; Zheng *et al.*, 2019).

Exemplos de fatores exógenos ao hospedeiro, associados ao desenvolvimento do câncer de colo são o trauma no epitélio de revestimento do colo do útero, o uso de contraceptivos orais por períodos longos, o estresse, o tabagismo e a deficiência nutricional. Fatores exógenos ao hospedeiro que acarretam um maior risco de contrair a infecção pelo HPV são a iniciação precoce da atividade sexual, a multiplicidade de parceiros sexuais, a presença de coinfeções com outros patógenos e de outras infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) (Chelimo *et al.*, 2013; Hong & Laimins, 2017; Torre *et al.*, 2017; Aksoy *et al.*, 2017; Sellors, John W. Sankaranarayanan, 2003; Zheng *et al.*, 2019).

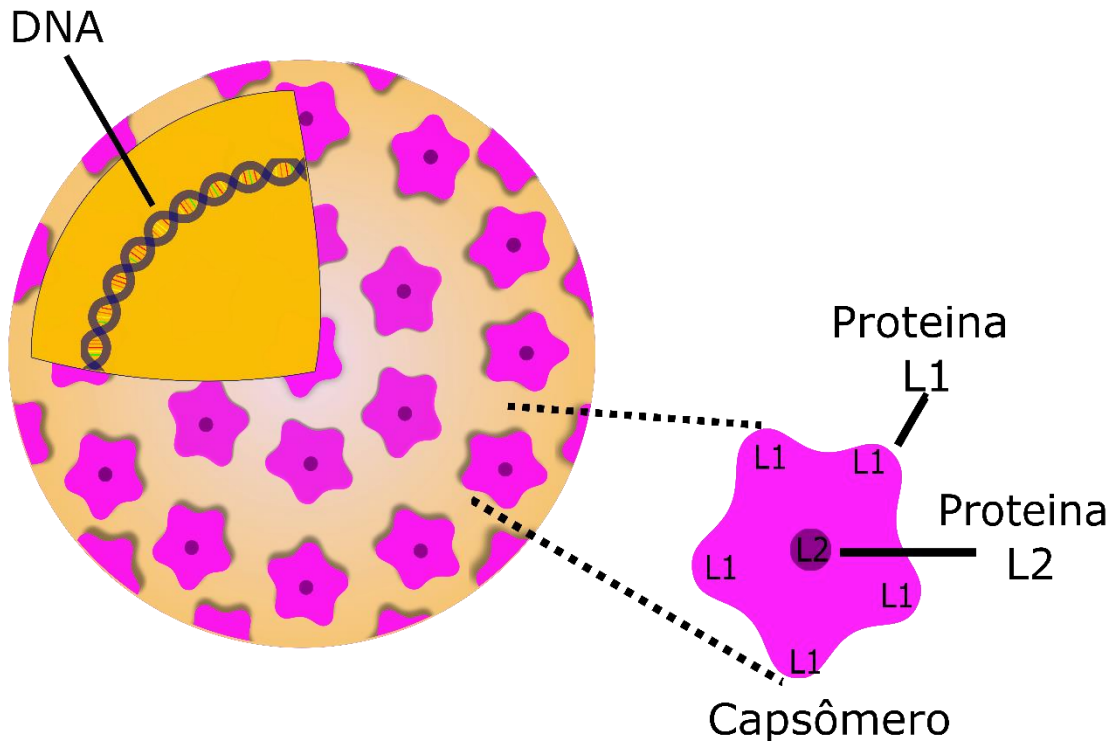
Entre os fatores relacionados ao HPV destacam-se: o potencial oncogênico do tipo de HPV infectante e a carga viral que podem permitir uma maior persistência da infecção pelo HPV, acarretar instabilidade cromossômica em sítios do genoma do hospedeiro e facilitar a integração do genoma viral ao DNA do hospedeiro (Martins *et al.*, 2016; Sanjosé, de *et al.*, 2018; Durzynska *et al.*, 2017).

A persistência do HPV pode ser causada por uma infecção subclínica (Egawa *et al.*, 2015), na qual se favorece a replicação viral e a produção de partículas virais, aumentando dessa forma a probabilidade de desenvolvimento de lesões intra-epiteliais. Nesse processo, fatores relacionados aos distintos tipos de HPV estão potencialmente envolvidos (Egawa *et al.*, 2015; Schiffman *et al.*, 2016; Borruto & Ridder, De, 2012).

### 1.2.1 O genoma do HPV

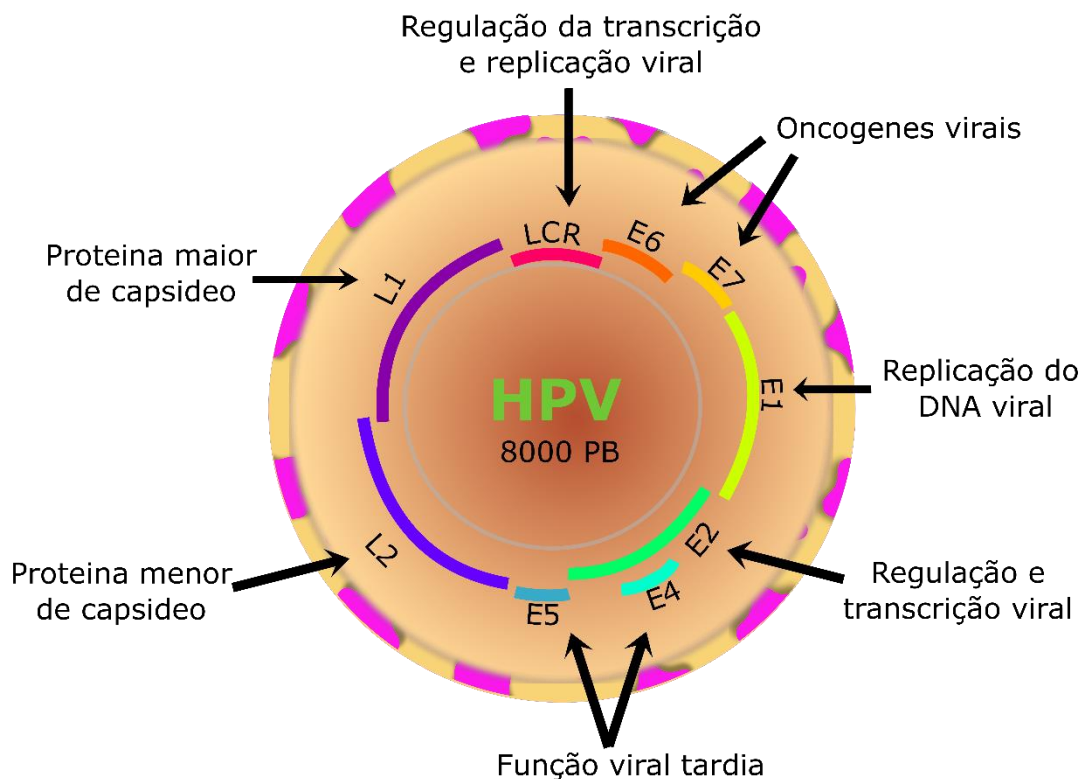
Pertencendo à família *Papovaviridae* (Bujarski *et al.*, 2019), o HPV é um vírus não envelopado e icosaédrico de tamanho aproximado de 55 nm (Lima, 2017; Zheng *et al.*, 2019). A ausência de um envelope lipídico o torna mais estável, portanto mais infeccioso durante meses em ambientes geralmente desfavoráveis a outros vírus (la Garza-Salazar, de *et al.*, 2017). Como característica geral, o HPV apresenta um

genoma composto de DNA fita dupla, circular, episossomal, com aproximadamente 8 Kb (Ibeanu, 2011; Johannsen & Lambert, 2013).



**Figura 1. Estrutura do vírus do HPV.** O vírus HPV tem forma icosaédrica, coberta por um Capsídeo formado por 72 capsômeros constituídos por duas proteínas estruturais: a proteína principal do capsídeo (L1) e a proteína secundária do capsídeo (L2). No interior do capsídeo está localizado o DNA de fita dupla circular.

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: (i) Região precoce (*Early Region – E*), que apresenta atividade transcricional desde os primeiros estágios da infecção, e composta pelos genes *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*; e a (ii) Região tardia (*Late Region– L*), expressa nos estágios finais da infecção viral, sendo composta pelos genes *L1* e *L2*; (Groves & Coleman, 2015; Graham, 2017).



**Figura 2. Estrutura do genoma do HPV 16.** O genoma circular do HPV é composto por 8.000 pares de bases em fita dupla. No esquema está representada a organização dos genes que codificam as proteínas precoces (*E-Early*), as proteínas tardias (*L-Late*) e a região reguladora longa (*LCR-Long Control Region*), com suas respectivas funções.

### Região precoce (Early Region – E)

As proteínas codificadas pelos genes da região precoce *E* participam da replicação viral e da transformação das células do hospedeiro. Os genes localizados nessa região que contem cerca de 4000 pares de bases, induzem a expressão de proteínas reguladoras denominadas *E1* e *E2* (que atuam na replicação e na transcrição do DNA viral), *E4* (na amplificação do vírus), e *E5*, *E6* e *E7* (atuam na imortalização/transformação de queratinócitos) (Chan *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2019).

O gene *E1* é um dos mais conservados entre diferentes tipos de HPV. Durante a replicação a proteína *E1* é encarregada de copiar o genoma viral no núcleo da célula infectada (Bergvall *et al.*, 2013), e de manter a sua replicação dentro da mesma (Egawa *et al.*, 2012). A *E1* se liga à Origem de Replicação (ORI) - sequência no genoma onde a replicação se inicia, promove a abertura da dupla-fita de DNA, e inicia a replicação, do DNA celular e do DNA viral, sendo este processo afetado pela baixa

especificidade de E1 pelos sítios de ligação no DNA da célula hospedeira (Bergvall et al., 2013).

A proteína codificada pelo gene *E2* é a principal em regular a transcrição viral podendo ativar ou reprimir a transcrição dos genes virais, desempenhando um importante papel regulador na expressão dos oncogenes *E6* e *E7* (McBride, 2013; Durzynska et al., 2017). A *E2* também sustenta e intensifica as funções de *E1* na replicação, promovendo o recrutamento e o reconhecimento de *E1* a sítios da ORI, e assim dar início à replicação viral na célula do hospedeiro (Bergvall et al., 2013; Anacker & Moody, 2017).

Durante a divisão de células infectadas, a proteína *E2* interage com proteínas do hospedeiro associadas à cromatina para facilitar a retenção, a manutenção e a duplicação do genoma viral (McBride, 2013; Graham, 2016, 2017). É importante salientar que as funções de *E2* podem ser interrompidas por mutações no gene que a codifica, ou pela integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, impedindo a atividade repressora da transcrição exercida por *E2* e favorecendo a expressão dos genes virais *E6* e *E7* (McBride, 2013).

O gene *E4* foi descoberto em verrugas induzidas por infecção pelo HPV, pois o transcrito de *E4* é o detectado em maior quantidade neste tipo de lesão, razão pela qual a proteína *E4* é utilizada como marcador de intensidade dessas alterações cutâneas ou genitais. Este marcador é mais abundantemente encontrado nos estratos superior e intermediário do epitélio estratificado da pele ou mucosas, durante a infecção ativa (Doorbar, 2013; Griffin et al., 2015).

A *E4* está relacionada à etapa tardia da infecção, momento onde é expressa para modular a amplificação do genoma e a produção de virions (Doorbar, 2013; Tommasino et al., 2011). Também se sugere que a *E4* tenha função de alterar a estrutura da rede de cito-queratina das células infectadas para formar uma estrutura cornificada e facilitar a liberação e a transmissão do vírus (Ibeanu, 2011; Doorbar, 2013; Tommasino et al., 2011). E por último foi descrita a capacidade de *E4* em inibir a proliferação celular na fase G2 do ciclo celular (Doorbar, 2013)

A proteína *E5* atua modulando a atividade de proteínas celulares, especialmente na replicação viral, mas não apresenta potente ação transformadora, além de necessitar de cofatores para aprimorar sua atividade (Venuti et al., 2011;

Tommasino *et al.*, 2011). O potencial carcinogênico de E5 se relaciona com a hiperplasia epidérmica, necessitando do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor*) - presente na membrana plasmática da célula hospedeira - para apresentar atividade transformadora e mitogênica (DiMaio & Petti, 2013; Johansson & Schwartz, 2013; Mattoscio *et al.*, 2018). É reportado em estudos *in-vitro*, que a E5 também promove a fusão de células formando células binucleadas, assim como causa a duplicação do número de cromossomos por endo - replicação, para finalmente, produzir instabilidade cromossômica durante a divisão celular. É sugerido ser essa a via pela qual a E5 induz a transformação da célula que irá favorecer a progressão das neoplasias (DiMaio & Petti, 2013).

Na replicação, a E5 permite aos queratinócitos diferenciados manter a capacidade proliferativa, tornando-se necessária para a amplificação do genoma viral e a ativação dos genes tardios (DiMaio & Petti, 2013; Graham *et al.*, 2017). Adicionalmente em conjunto com E6, a E5 induz a formação de vacúolos perinucleares ou coilócitos, tornando a célula frágil e favorecendo a liberação do HPV para o meio extracelular (Venuti *et al.*, 2011; DiMaio & Petti, 2013). A expressão de E5 contribui para o aumento das funções de E6 e E7, favorecendo a progressão ao câncer (Venuti *et al.*, 2011; Oliveira, 2016; Durzynska *et al.*, 2017).

A principal proteína viral indutora de transformação carcinogênica celular, a E6, se une a uma proteína Ubiquitina ligase - a Proteína Associada a E6 ou E6AP (*E6-Associated Protein*) - e ao supressor de tumor p53 (que têm ação no controle do ciclo celular e inibição do processo de crescimento tumoral), para formar assim o complexo E6/E6AP/p53, que será ubiquitinizado e em consequência, degradado em proteossomas (Hoppe-Seyler *et al.*, 2018; Wallace *et al.*, 2017).

A E6 é capaz de se ligar a proteínas com domínio PDZ - sequência de aminoácidos homologa às encontradas nas proteínas **P** *Post-synaptic density 95* - PSD-85, **D** *Discs large* - Dlg; **Z** e *Zonula occludens-1* - ZO-1. As proteínas PDZ permitem a ligação de E6 a receptores da membrana para ativar a telomerase. Esta consiste em grande complexo enzimático que adiciona repetições terminais nos telômeros, sequências localizadas ao final dos cromossomos da célula hospedeira. Por meio da ativação da telomerase, a E6 induz ao aumento do tempo de vida dos

queratinócitos, além de sua capacidade de replicação (Pol, Vande & Klingelhutz, 2013; Hoppe-Seyler *et al.*, 2018).

A proteína E6 permite ainda a evasão das células à apoptose mediante ativação de NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor-kappa B*) - complexo proteico que atua no controle da transcrição do DNA, e que induz a expressão de cIAP2 (*Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 2*), proteína inibidora de apoptose. Além disso, a E6 pode se unir à Pró - caspase 8, evitando a resposta da célula ao estímulo apoptótico (Pol, Vande & Klingelhutz, 2013; Lima, 2017). A E6 também contribui à evasão da resposta imune, aumentando a resistência da célula hospedeira aos estímulos antivirais induzidos pelos Interferons (Pol, Vande & Klingelhutz, 2013).

Juntamente com a atividade de E6, a ação da proteína E7 é uma das mais estudadas. A E7 se une ao supressor de Tumor - a proteína do Retinoblastoma (pRb), sendo este degradado e inativado, e favorecendo à proliferação celular (Porter *et al.*, 2017; Hoppe-Seyler *et al.*, 2018; la Garza-Salazar, de *et al.*, 2017). A proteína pRb des-fosforilada pode inibir a progressão do ciclo celular se ligando ao Fator de transcrição E2 ou *E2F (Transcription-factor E2)*, o qual regula o ciclo celular e a síntese de DNA (Doorbar *et al.*, 2012; Sanjosé, de *et al.*, 2018). A E7 se une com menor afinidade à Proteína do Retinoblastoma tipo 2 ou p130 (*Retinoblastoma-Like protein2*), e à Proteína do Retinoblastoma tipo 1 ou p107 (*Retinoblastoma-Like protein1*), fatores de transcrição que regulam o ciclo celular pela interação com o Fator de transcrição E2F, e assim desencadeiam uma maior proliferação celular (Schiffman *et al.*, 2016; Anacker & Moody, 2017; Moody *et al.*, 2017).

Outra função de E7 é manter a atividade de Cdk2 ou Quinase Dependente de Ciclina 2 (*Cyclin Dependent Kinase 2*), por interação com as Ciclinas E e A, mantendo os níveis elevados da Fosfatase Cdc25a, e assim bloqueando a fosforilação inibitória de Cdk2. Quando des-fosforilada Cdk2 favorece a replicação viral promovendo o acúmulo de E1 no núcleo celular, e favorecendo dessa forma a amplificação viral (Ibeanu, 2011; Crosbie *et al.*, 2013; Moody *et al.*, 2017). Quando expressa na ausência da proteína E6, a proteína E7 promove a apoptose de linhagens celulares de câncer do colo do útero, 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).



A expressão persistente das oncoproteínas E6 e E7 favorece o desenvolvimento do Câncer invasivo, pelos efeitos destas sobre a instabilidade cromossômica, e a alteração do ciclo de duplicação do centrôssoma (Pol, Vande & Klingelutz, 2013; Roman & Munger, 2013; Graham, 2017). Como será destacado adiante, durante a integração do DNA do HPV ao genoma do hospedeiro pode ocorrer a quebra das regiões reguladoras *E1/E2*, resultando na super - expressão das oncoproteínas E6 e E7 (McBride, 2013; Roman & Munger, 2013).

### **Região tardia (*Late Region– L*)**

Esta é a região do genoma viral que codifica as proteínas constituintes do capsídeo viral, e que facilitam o ingresso do HPV na célula hospedeira (Graham *et al.*, 2017).

A L1 é a proteína principal do capsídeo e que apresenta maior exposição na superfície do vírus. Esta faz o primeiro contato com a célula do hospedeiro, interagindo com carboidratos de Sulfato de Heparan (*Heparan sulfate - HS*) expressos nos proteoglicanos da membrana (Buck *et al.*, 2013). Esta interação permite a exposição de L2 que será clivado pela Furina - uma protease celular, permitindo ao HPV se unir a um receptor, ainda não identificado, da superfície da célula (Buck *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2019). Após a internalização há a acidificação de vesículas de endocitose, onde ocorre a perda do capsídeo viral e a retenção das partículas de L1 dentro dos endossomas da célula hospedeira (Buck *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2019).

A proteína L1 poderá induzir o desenvolvimento da resposta imune do organismo, com indução da produção de anticorpos anti - HPV a partir dos 6 meses após infecção (Crosbie *et al.*, 2013). Sendo L1 uma proteína antigênica do HPV, a sua síntese por expressão recombinante em leveduras e células de insetos tem sido utilizada para a produção de diferentes vacinas anti - HPV (Crosbie *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2019).

Finalmente, por ser o gene mais conservado do genoma viral, a classificação do HPV é baseada na variação da sequência de nucleotídeos da ORF do gene *L1*, onde os diferentes gêneros apresentam uma homologia nas sequências de acima de 60%, e são da mesma espécie de HPV se exibem uma homologia das sequências de *L1* entre 60% a 70%. Nos tipos de HPV ocorre variação de acima de 10% das sequências de *L1* entre tipos de HPV já existentes, e quando dentro de um mesmo

tipo há uma variação entre 2% e 10% das sequências de *L1* esses são classificados em subtipos. Uma nova variante do HPV é descrita quando a variação nas sequências de *L1* é menor do que 2% (De-Villiers *et al.* 2004, Bzhalava *et al.*, 2015; Sanjosé, de *et al.*, 2018).

A proteína secundária do capsídeo, a *L2*, quando clivada pela protease celular Furina, facilita a ligação do HPV ao receptor secundário da superfície da célula hospedeira (Wang & Roden, 2013; Zheng *et al.*, 2019). Após sua internalização no interior dos endossomas, o HPV passa por uma dissociação onde perde a proteína *L1*. Porém a proteína *L2* consegue deixar o endossoma junto com o DNA viral (*viral DNA* – *vDNA*), sob a forma de complexo *L2-vDNA*, para logo interagir com as proteínas motoras associadas ao Citoesqueleto, as cadeias leves *T1* e *T3* da Dineína (*Dyneine* - *Dyn*) - *DYNLT1* e *DYNLT3* (*Dynein light-chain 1* e *Dynein light-chain 3*), e mobilizar-se com o DNA viral pelo citoplasma até ganhar acesso ao núcleo celular (Wang & Roden, 2013).

Ainda é pouco conhecido o modo pelo qual o complexo *L2-vDNA* ingressa dentro do núcleo celular. Uma possibilidade é que seja através dos poros nucleares mediante a interação com a sequência dos Sinais de Localização Nuclear (SLN) de Carioferinas e componentes do Complexo do Poro Nuclear (CPN). Outra possibilidade seria o complexo *L2-vDNA* aproveitar as fases do ciclo nas quais o Envoltório Nuclear (EN) não estaria completamente aderido ao DNA da célula hospedeira, como observado ao final da Interfase e/ou início da Prófase. Uma terceira possibilidade de acesso seria pela interação do complexo *L2-vDNA* com a proteína *HSC70* (*Heat Shot Cognate 71* kDa) a qual participa tanto do transporte pelo citoplasma, quanto do ingresso de várias proteínas ao núcleo (Wang & Roden, 2013).

Adicionalmente, durante o ciclo produtivo viral as proteínas *L1* e *L2* são expressas nas células das camadas superficiais do epitélio, onde ocorre a associação dessas proteínas para formação do capsídeo dos novos vírus, que serão posteriormente liberados da célula como já descrito (Ibeanu, 2011; Buck *et al.*, 2013; Crosbie *et al.*, 2013; Moody *et al.*, 2017).

### **Região reguladora longa (*Long Control Region* – *LCR*)**

Com aproximadamente 1000 pares de bases a *LCR* é a região não codificadora do genoma viral, importante na regulação da replicação e transcrição virais, porque

apresenta a ORI (Johannsen & Lambert, 2013) e os promotores da transcrição de sequências da região *E*, os quais podem variar segundo o tipo de HPV (promotores p97 no HPV16 e p105 no HPV18) (Graham, 2017; Anacker & Moody, 2017).

### 1.2.2 Classificação do HPV

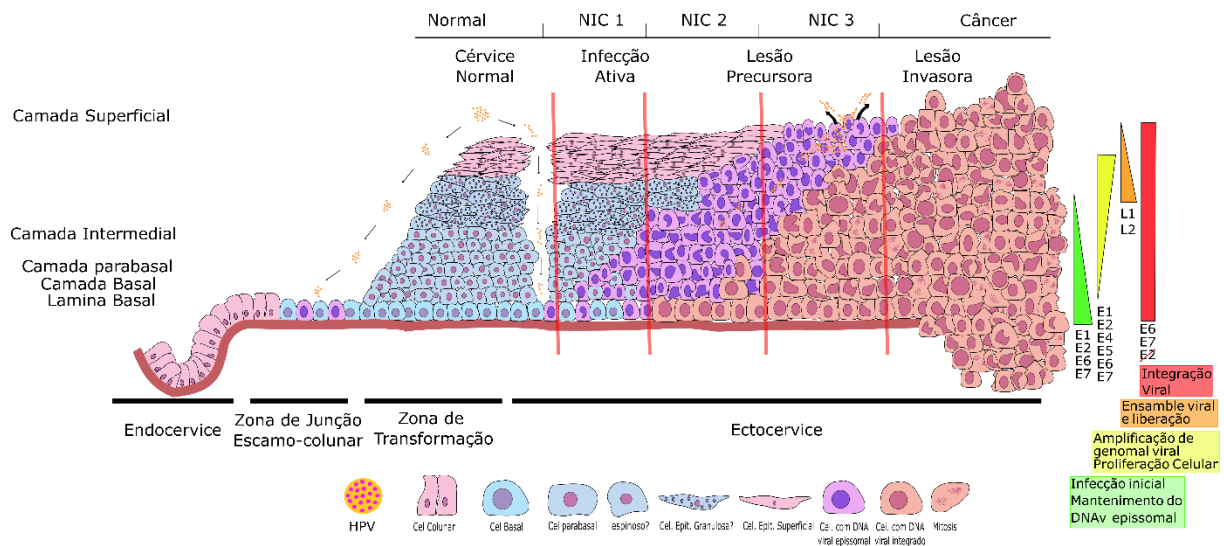
Até o momento, mais de 200 tipos distintos de HPV já foram caracterizadas e agrupados em cinco gêneros baseados na homologia da sequência de *L1*:  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta),  $\gamma$  (gamma),  $\mu$  (mu) e  $\nu$  (nu) (Doorbar *et al.*, 2012; Egawa *et al.*, 2015; Graham, 2017). Neste contexto, 90% dos tipos de HPV pertencem ao grupo  $\alpha$  (alfa) e  $\beta$  (beta), e são classificados segundo o seu potencial oncogênico: no grupo  $\alpha$  estão os principais tipos causadores de câncer e no grupo  $\beta$  os tipos associados a infecções assintomáticas (Doorbar *et al.*, 2012; Ikenberg, 2014; Graham, 2017). Também são agrupados segundo o tropismo: aqueles que infectam a superfície da pele como HPVs cutâneos, e aqueles que infectam a mucosa da cavidade oral, trato respiratório e trato ano genital, como HPVs mucosotrópicos (Mistry *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2013; Kwak *et al.*, 2014).

De acordo com o seu potencial oncogênico, relacionado ao desenvolvimento do câncer em diversos sítios anatômicos, os tipos de HPV podem ser classificados em duas categorias: **(i)** os HPVs de alto risco (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68), onde os HPV16 e HPV18 são os mais prevalentes por estarem presentes na maior parte dos casos de câncer do colo do útero, e **(ii)** os HPVs de baixo risco (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 54, 61, 70, 72 e 81), onde os HPV6 e HPV11 são os mais prevalentes causando lesões benignas (Ikenberg, 2014; Graham, 2017).

### 1.2.3 Ciclo de vida do HPV

O ciclo viral começa com o ingresso do HPV nas células basais que revestem a ectocérvice, por meio de micro - traumas ou abrasões no epitélio escamoso, que cobrem a cérvice uterina. As células da Junção Escamo-Colunar (JEC) - área de transição localizada entre os epitélios glandular (endocérvice) e escamoso (ectocérvice) - são especialmente envolvidas na Carcinogênese cervical (Herfs *et al.*, 2012). Como mencionado, o HPV ingressará na célula hospedeira por endocitose pela

ação das proteínas L1 e L2 com receptores da superfície celular (Doorbar *et al.*, 2012; Wang & Roden, 2013; Graham, 2017). Para se multiplicar, o HPV aproveitará a maquinaria de replicação das células da camada basal do epitélio, que estão em constante proliferação (la Garza-Salazar, de *et al.*, 2017).



**Figura 3 Ciclo de vida de HPV no Colo do Útero.** Os eventos envolvidos e as proteínas expressas durante a infecção, se encontram do lado direito da ilustração enquanto no lado esquerdo se indica as camadas do epitélio cervical. O HPV infecta as células da camada basal na zona de Junção Escamo-colunar ou através de lesões na ectocérvice, onde se inicia a amplificação viral. O genoma viral será transmitido para as células filhas durante a divisão celular migrando para as camadas superiores. Na camada superficial acontece a última etapa da infecção ativa onde os vírions são liberados. A persistência da infecção promove uma integração do genoma viral ao genoma hospedeiro, onde E2 deixa de ser expressa e as proteínas E6 e E7 são mais expressas, transformando a lesão em um carcinoma invasor, possibilitando a ruptura da lâmina basal e posterior invasão dos tecidos adjacentes. Adaptado de S. de San Jose *et al.*, 2018; Schiffman *et al.*, 2016.

Uma vez dentro do núcleo, E1 e E2 são as primeiras proteínas virais a serem sintetizadas, controlando assim a replicação do DNA viral em baixos níveis, além de controlar a transcrição dos demais genes. Essa etapa da infecção é considerada não - produtiva, porque a quantidade de cópias virais produzidas ainda é baixa - aproximadamente 100 cópias do genoma por célula, e porque ainda não foram produzidos novos vírions (Doorbar *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2019).

A célula hospedeira replicará simultaneamente o seu DNA e o DNA viral, sendo esse posteriormente distribuído às células filhas (Zheng *et al.*, 2019). Após diferenciação das células basais e migração dessas às camadas intermediárias, o HPV irá expressar as proteínas E6 e E7 permitindo essas células realizar a proliferação, o prolongamento do ciclo celular e a prevenção da apoptose (Crosbie *et*

*al.*, 2013). Essa fase da infecção é conhecida como fase produtiva do Ciclo viral, onde o HPV replica o seu material genético (em células das camadas intermediária e superficial) independentemente da célula hospedeira (Moody *et al.*, 2017). A proteína E5 potencializará os efeitos de E6 e E7, assim como a replicação viral (Venuti *et al.*, 2011; DiMaio & Petti, 2013).

Diante da maior produção de cópias do genoma viral, a transcrição dos genes *L1* e *L2* é iniciada nas células da camada superficial, com formação do capsídeo para os novos vírus (Ibeanu, 2011; Buck *et al.*, 2013; Wang & Roden, 2013). A proteína E4 é então expressa para permitir a liberação de novos vírions, e a disseminação do HPV em novas células do hospedeiro (Ibeanu, 2011; Doorbar *et al.*, 2012). As células da camada basal do epitélio cervical infectadas serão um reservatório permanente do DNA viral, enquanto que as novas partículas virais serão liberadas com os queratinócitos durante a descamação das células da camada superior do epitélio (Burd, 2003; Schiffman *et al.*, 2007; Groves & Coleman, 2015).

#### 1.2.4 Integração do genoma viral

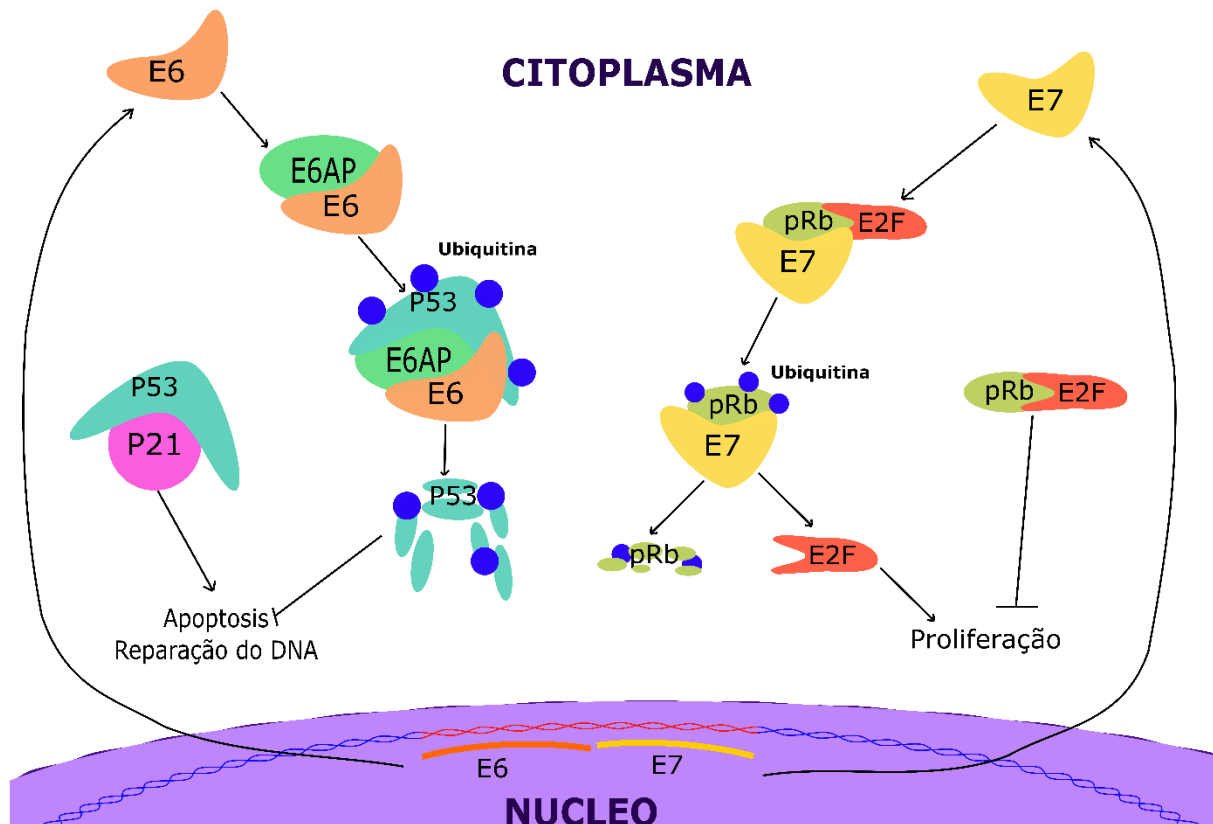
Em lesões pré-cancerosas o DNA viral é mantido na forma epissomal e extra - cromossômica, mas em lesões mais avançadas pode estar integrado ao genoma do hospedeiro (Nguyen *et al.*, 2014; Warburton *et al.*, 2018; Spriggs *et al.*, 2017). A Integração não é parte do Ciclo de replicação do HPV, mas pode ocorrer durante qualquer etapa da infecção, sendo observada tanto no câncer invasor quanto em etapas de lesões iniciais (Doorbar, 2006; Graham, 2017; McBride & Warburton, 2017). Fatores endógenos e exógenos - como a inflamação induzida pelo HPV e a presença de co - infecções com outros agentes, podem acumular danos nos cromossomos do hospedeiro, ativando o mecanismo de reparo do DNA do hospedeiro, contribuindo assim para a ocorrência de integração do DNA viral no genoma humano (Groves & Coleman, 2018; Spriggs *et al.*, 2017; Speel, 2017).

A integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro constitui um importante mecanismo relacionado à indução ao câncer (Liu *et al.*, 2015; Warburton *et al.*, 2018; Bouchilloux *et al.*, 2019). Geralmente a ausência de Integração está associada a lesões benignas e a presença dessa é associada às NICs e ao câncer invasor positivos para o HPV (Li *et al.*, 2018; Bouchilloux *et al.*, 2019). Estudos apontam frequências distintas de Integração do DNA dos HPVs de alto risco, em amostras de

câncer do colo do útero positivas aos HPVs oncogênicos: acima de 90% do HPV18, acima de 80% do HPV45, entre 50–80% do HPV16 e entre 15–40% do HPV31 e HPV33 (McBride & Warburton, 2017; Speel, 2017).

Existem três modelos distintos de Integração: o Tipo 1 onde uma cópia simples do genoma viral é integrada ao genoma do hospedeiro; o Tipo 2 onde um concatâmero (molécula de DNA com múltiplas cópias da mesma sequência do genoma do vírus) do genoma viral é integrado ao genoma do hospedeiro (Johannsen & Lambert, 2013; McBride & Warburton, 2017; Groves & Coleman, 2018); e o Tipo 3 onde vários concatâmeros são integrados de forma intercalada no genoma do hospedeiro (Oyervides-Muñoz *et al.*, 2018; Redmond *et al.*, 2018). Os sítios de Integração podem estar distribuídos aleatoriamente no genoma do hospedeiro, mas estão associados a sítios frágeis comuns e regiões de transcrição preferencialmente ativas (Warburton *et al.*, 2018; Mittal & Banks, 2017). Além disso, a Integração pode ativar oncogenes celulares, inibir genes supressores de tumor ou induzir à reorganização das regiões flanqueadoras dos sítios de Integração (Warburton *et al.*, 2018; Bouchilloux *et al.*, 2019).

A integração do genoma dos HPVs de alto risco ao genoma da célula do hospedeiro acarreta na maioria das vezes em interrupção nas ORFs dos genes *E1* e *E2* que perderão as suas funções como reguladores dos genes *E6* e *E7* (Warburton *et al.*, 2018; Durzynska *et al.*, 2017). Como consequência, ocorre uma super-expressão dos genes *E6* e *E7*, cujas proteínas contribuirão à imortalização e à transformação maligna das células que compõem o epitélio de revestimento da mucosa cervical (Crosbie *et al.*, 2013; Prati *et al.*, 2018). Como já destacado, a *E6* atua degradando p53, e a *E7* degradando pRb (Hoppe-Seyler *et al.*, 2018), prevenindo a apoptose e favorecendo a proliferação celular, eventos esses que podem conduzir à progressão para o câncer (Crosbie *et al.*, 2013). Além disso, a Integração poderia aumentar a estabilidade dos RNAs mensageiros (RNAm) transcritos virais *E6* e *E7*, elevando assim, o nível de expressão e a oncogenicidade dos HPVs (Bodelon *et al.*, 2016; Bouchilloux *et al.*, 2019).



**Figura 4. Alteração das funções das proteínas P53 e pRb.** Na infecção por HPV, as proteínas E6 e E6AP formam um complexo que se une a p53, a qual será ubiquitinizada, inibindo a apoptose e o reparo do DNA celular. A proteína E7 expressa se une a pRb, e libera o fator de transcrição E2F, promovendo assim, a proliferação da célula infectada.

Em resumo, a Integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro pode contribuir à carcinogênese de distintas formas: **i)** ocorrer sobre sequências de genes supressores de tumor (GST) resultando na perda da sua função; **ii)** ocorrer sobre sequências adjacentes a um oncogene, que poderia iniciar ou aumentar a amplificação e/ou expressão de um promotor viral, e por último **iii)** causar a reorganização intra ou inter - cromossomal de oncogenes ou GST seguida de expressão alterada desses genes nas regiões afetadas (Oyervides-Muñoz *et al.*, 2018; Speel, 2017).

### 1.3 Lesões pré-neoplásicas do Câncer do colo de útero

Uma infecção persistente por HPVs de alto risco poderá desenvolver lesões no epitélio cervical (Chan *et al.*, 2019), lesões estas classificadas em esfregaços cervicais segundo o Sistema de *Bethesda*, como Lesões Intra-epiteliais Escamosas de Baixo-

grau (LIEB), ou como Lesões Intra-epiteliais Escamosas de Alto-grau (LIEA), refletindo ainda o estado da infecção por HPV (Schiffman *et al.*, 2016; Herrington, 2017). O Sistema de *Bethesda* propõe a utilização de terminologia uniforme com informação clínica relevante emitida pelos Laboratórios, permitindo um melhor entendimento das lesões pré – neoplásicas e neoplásicas em reportes de exame de Citologia cervical (Solomon, 2002; Nayar & Wilbur, 2015).

Adicionalmente, por meio de critérios histopatológicos descritos por (Richart, 1967) baseados na presença de alterações celulares e no grau de envolvimento das camadas do epitélio cervical (Kurman *et al.*, 2014, 2019), as lesões epiteliais induzidas pelo HPV, também podem ser classificadas segundo a progressão da displasia em Neoplasia Intra-epitelial Cervical (NIC) de grau 1 (NIC1) que corresponde à LIEB no Sistema *Bethesda*, e as NICs de graus 2 e 3 (NIC2 e NIC3) as quais correspondem a lesões do tipo LIEA. Estudos demonstram que a progressão das lesões cervicais de NIC1 a NIC2, e dessas a NIC3 está relacionada à expressão das Oncoproteínas E6 e E7, iniciando com níveis baixos de expressão dessas proteínas que vão aumentando até a progressão a NIC3 (Doorbar *et al.*, 2012; Harden & Munger, 2017). Contudo, é possível observar a regressão espontânea das NICs para um estado normal do epitélio, mesmo na ausência de tratamento (Chan *et al.*, 2019; Durzynska *et al.*, 2017).

Tipo inicial de lesão cervical induzida pelo HPV, a NIC1 se apresenta como leve displasia, onde a proliferação de células do estrato basal se restringe ao primeiro terço do epitélio, com presença ocasional de figuras mitóticas (Richart, 1967) . Histologicamente, as lesões de NIC1 apresentam células com atipias nucleares, às vezes bi-nucleação, e cromatina nuclear com característica granulada e irregular, com ou sem presença de nucléolo(Herrington, 2017). O núcleo celular pode apresentar ao seu redor uma região clara do citoplasma de bordas irregulares - os coilócitos, que são formados durante a infecção pelo HPV, o qual produz alterações no citoesqueleto celular formando essa cavidade citoplasmática, sinal esse considerado característico e altamente indicativo de infecção por HPV (Kurman *et al.*, 2019).

Nas lesões do tipo NIC2, a proliferação de células do estrato basal atinge os dois primeiros terços do epitélio, apresentando-se como uma displasia moderada (Schiffman *et al.*, 2016; Kurman *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2019). Pela histologia, as



células apresentam uma relação Núcleo: Citoplasma (N:C) elevada, além da presença de atividade mitótica (Herrington, 2017; Kurman *et al.*, 2019).

A lesão do tipo NIC3 se caracteriza por apresentar a proliferação de células do estrato basal na totalidade da espessura do epitélio escamoso, apresentando essas células um grau acentuado de displasia (Richart, 1967). Histologicamente, não há distinção entre as camadas do tecido epitelial; as células apresentam elevada relação N:C, e as figuras mitóticas aparecem até no terço superior do epitélio (Herrington, 2017; Kurman *et al.*, 2019). Esta lesão é considerada pré-cancerosa com um grande potencial de progredir para o câncer invasor (Chan *et al.*, 2019).

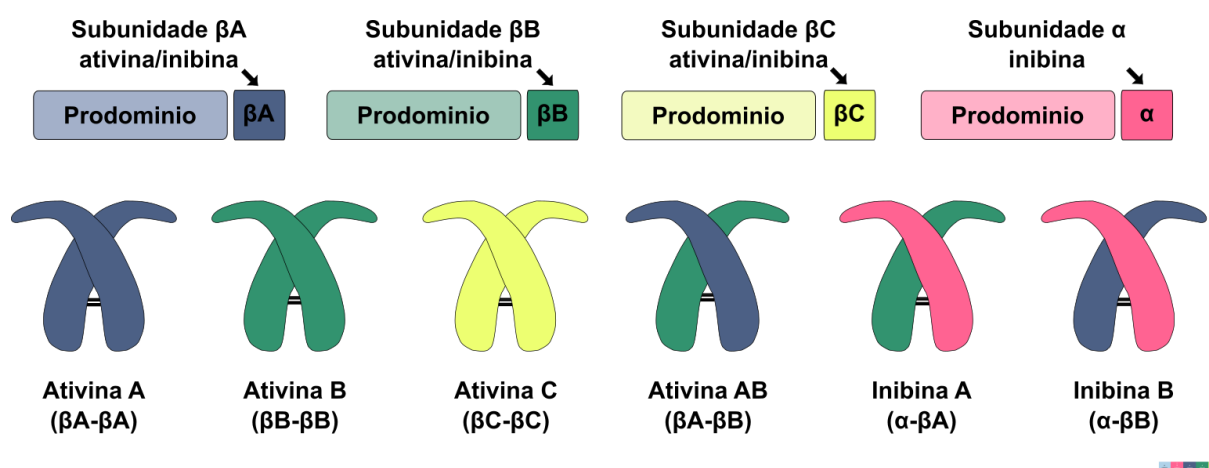
#### **1.4 HPV: Resposta Imune e citocinas envolvidas na infecção pelo HPV**

A resposta do sistema imune do hospedeiro contra o HPV começa com o contato do HPV com as células do colo do útero que iniciam a resposta anti-viral com a produção de interferons (IFNs) e citocinas. Contudo a resposta é dependente do tipo do HPV em questão. Estudos propõem que HPVs de alto risco podem diminuir a resposta imune inata local, frente à infecção (Tummers & Burg, van der, 2015; Schiffman *et al.*, 2016; Graham, 2017; Hong & Laimins, 2017). A resolução da infecção requer o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa baseada na ação **(i)** de células CD56 citotóxicas e de células T citotóxicas CD8 antígeno-específicas - ambas produtoras de Granzima B, e **(ii)** de células T CD4 Th1 produtoras de Interleucina (IL)-2 e IFN- $\gamma$ , para o reconhecimento das oncoproteínas E6 e E7 (Woo *et al.*, 2008; Tummers & Burg, van der, 2015; Schiffman *et al.*, 2016).

Um dos principais produtos liberados no processo inflamatório são as citocinas, com destaque para as citocinas da superfamília do Fator de Crescimento Transformante  $\beta$  (*Transforming Growth Factor* – TGF- $\beta$ ). Estas citocinas podem regular o crescimento celular, diferenciação, apoptose, entre outros processos celulares (Jakowlew, 2006; Syed, 2016; Abbas *et al.*, 2017). Mas no câncer, membros da família TGF- $\beta$  podem apresentar uma resposta dupla: atuando em fases iniciais como supressores tumorais, e nas fases tardias podem favorecer a invasão e metástase (Syed, 2016). Neste âmbito, emergem as ativinas, importantes reguladores da diferenciação celular em condições normais ou patológicas, e que pertencem à superfamília de Fatores de Crescimento TGF- $\beta$ .

## 1.5 Ativinas

Inicialmente descritas como estimuladoras da secreção do Hormônio Folículo Estimulante (*Follicle Stimulating Hormone-FSH*) pela adenohipófise (Muttukrishna *et al.*, 2004; Kaneko, 2016a), as ativinas são dímeros polipeptídicos unidos por uma ponte di - sulfeto (Bloise *et al.*, 2019b). Existem 5 tipos de ativinas descritas (Figura 5): ativina A, formada por dois dímeros  $\beta A$  ( $\beta A$ -  $\beta A$ ), ativina B ( $\beta B$ -  $\beta B$ ) formada por dois dímeros  $\beta B$ , ativina AB ( $\beta A$ -  $\beta B$ ), ativina C ( $\beta C$ -  $\beta C$ ) e ativina E ( $\beta E$ -  $\beta E$ ) (Walton *et al.*, 2012; Bloise *et al.*, 2019b).



**Figura 5. Composição das unidades de Ativina e Inibina.** As ativinas são dímeros proteicos formadas por duas sub-unidades  $\beta$ : ativina A é composta por duas sub-unidades  $\beta A$ , ativina B por duas sub-unidades  $\beta B$ , ativina C por duas sub-unidades  $\beta C$  e a ativina AB por uma sub-unidade  $\beta A$  e uma sub-unidade  $\beta B$ . A Inibina, principal antagonista das ativinas, é formada por uma sub-unidade  $\alpha$  e uma sub-unidade  $\beta$ : quando a sub-unidade  $\beta$  é A forma Inibina A e se for uma sub-unidade  $\beta B$  forma Inibina B.

As ativinas sinalizam através de dois tipos de receptores transmembrana Serina/Treonina kinase - ou seja, que agem pela fosforilação de sítios ricos em Serina e Treonina, que 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.*, 2019b). Ambos receptores se caracterizam por serem moléculas transmembrana, com um domínio extracelular rico em cisteína com atividade de união ao ligante, e um domínio intracelular Serina/Treonina kinase (Kaneko, 2016a).

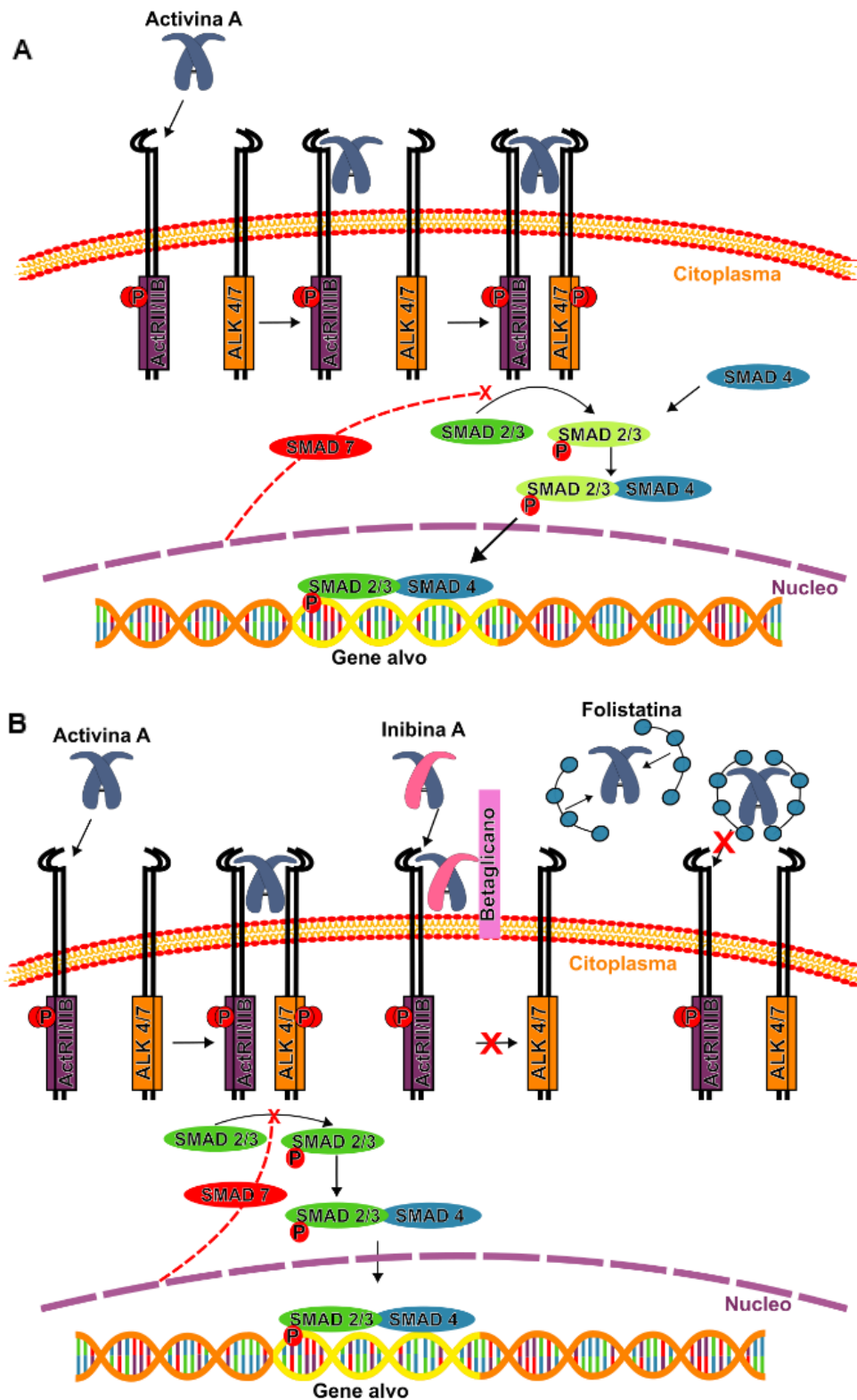
O ActR II possui dois homólogos ActRIIA e ActRIIB (Bloise *et al.*, 2019b; Kaneko, 2016a). O ActRI também possui homólogos, sendo o mais predominante o ActRIB, também conhecido como receptor de ativina tipo kinase 4 (*Activin receptor-*

*like kinase 4* ou ALK4); os outros homólogos são o ActRIC (ou ALK7) e ActRIA (Bloise *et al.*, 2019b; Kaneko, 2016a). 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, 2016a). 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.*, 2019b; Kaneko, 2016a). 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, 2016a) (Figura 6).

As ativinas podem ser produzidas por distintos tipos celulares e têm funções em diferentes células e tecidos (Kaneko, 2016a), como o rim (Maeshima *et al.*, 2008), fígado (Rodgarkia-Dara *et al.*, 2006) e componentes do sistema nervoso (Link *et al.*, 2016), entre outros. Contudo, as funções das ativinas no aparelho reprodutor são as mais estudadas (Shelling, 2012; Makanji *et al.*, 2014), sendo todas as suas funções biológicas no sistema reprodutor ainda não elucidadas (Kaneko, 2016a).

Quanto à regulação das cascatas de sinalização intracelular induzidas pelas ativinas, essas possuem vários elementos reguladores de sua atividade. Esses elementos se dividem em (i) reguladores intracelulares, como p38 MAPK (p38 *Mitogen-Activated Protein Kinase*), JNK (*JUN N-terminal kinase*), ERK (*Extracellular – signal Regulated kinase*), Cripto e SMAD7; e os (ii) reguladores extracelulares, que podem atuar sobre seus receptores de membrana, como a Folistatina (FST), a proteína tipo-Folistatina 3 (*Folistatin-like 3* ou FSTL3), a inibina e a ativina C, todos atuando por diferentes mecanismos (Kluzinska *et al.*, 2014; Makanji *et al.*, 2014; Syed, 2016; Bloise *et al.*, 2019b; Kaneko, 2016a).



**Figura 6. Sinalização e inativação celular de Ativina A.** **A)** Ativina A se unirá ao Receptor de Ativina tipo II (ActRII) e logo irá recrutar o Receptor de Ativina tipo I (ActRI) ou ALK4, momento no qual estes receptores são fosforilados e induzem a fosforilação interna de SMAD 2/3, para formar um complexo junto a SMAD4, o qual se transloca ao núcleo e modulará a expressão genética. **B)** A Inibina atua se unindo ao ActRII evitando a união da Ativina e recrutamento de ActRI; a Folistatina (FST) atua neutralizando a Ativina antes da união aos receptores de membrana. Elaboração própria.

É importante destacar que a principal via de sinalização intracelular controlada pelas ativinas é a via das SMADs. Quando ativado, o complexo SMAD que foi direcionado ao núcleo, ativa uma via de retroalimentação negativa, mediada pela SMAD7, o inibidor intracelular mais importante das ativinas, o qual impedirá a fosforilação de SMAD 2 e 3, quando da ativação de ActRI (Heldin & Moustakas, 2012; Macias *et al.*, 2015; Bloise *et al.*, 2019b).

Cripto é um tipo de Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor-EGF*), que antagoniza a sinalização das ativinas, ligando-se à ActRI localizada na membrana celular (Kluzinska *et al.*, 2014). A ativina C atua se unindo aos receptores ActRII e ActRI, sem induzir a fosforilação destes e como consequência não haverá a sinalização intracelular (Marino *et al.*, 2015; Gold *et al.*, 2009).

## 1.6 Inibinas

Proteína que deve seu nome por inibir a secreção de FSH no organismo (Bloise *et al.*, 2019b). As inibinas são dímeros proteicos pertencentes à super-família TGF- $\beta$ , formadas por duas sub - unidades peptídicas,  $\alpha$  e  $\beta$  ( $\beta$ A ou  $\beta$ B), existindo assim as isoformas Inibina A ( $\alpha/\beta$ A) e Inibina B ( $\alpha/\beta$ B) (Walton *et al.*, 2012; Bloise *et al.*, 2019b), Figura 5.

A ação inibitória das inibinas é realizada pela ligação da subunidade  $\alpha$  ao receptor betaglicano, com concomitante ligação da subunidade  $\beta$  (A ou B) ao receptor ActRII, (Bloise *et al.*, 2019b). A afinidade da inibina pelo ActRII é baixa mas na presença do receptor betaglicano forma um complexo de alta afinidade com o ActRII (Walton *et al.*, 2012; Walentowicz *et al.*, 2014). Esta interação bloqueia a ação das ativinas, ao competir com a subunidade  $\beta$  do dímero das ativinas pelo ActRII (Walentowicz *et al.*, 2014; Bloise *et al.*, 2019b) (Figura 6). Além do mais, no momento da síntese citoplasmática as inibinas sequestram as subunidades  $\beta$  necessárias para a síntese das ativinas, diminuindo assim a sua síntese (Walton *et al.*, 2012; Marino & Zanghi, 2013; Makanji *et al.*, 2014).

A expressão das inibinas se encontra elevada em mulheres com tumores epiteliais no ovário, mas em pacientes com câncer de mama as inibinas se encontram diminuídas (Makanji *et al.*, 2014), demonstrando que a sua desregulação é altamente tumor-dependente.

### 1.7 Folistatina

A Folistatina (FST) é uma proteína glicosilada de cadeia simples rica em Cisteína (Hashimoto *et al.*, 2000; Kaneko, 2016b). Encontrada em três iso-formas, FST 288, FST 315 e FST 303 (Hashimoto *et al.*, 2000; Keutmann *et al.*, 2004), sendo FST 288 a folistatina com maior afinidade, em especial pela ativina A (Hashimoto *et al.*, 2000). A FST 315 é a forma predominante na circulação, mas suas funções não estão muito bem elucidadas até o momento (Kaneko, 2016b). Além disso, foi descrita a FST-like 3 (FSTL3), também conhecida como Proteína Relacionada à Folistatina (*FST-Related Protein*, FSRP), sendo uma inibidora mais fraca da ativina endógena (Walton *et al.*, 2012).

A principal função da Folistatina é ser antagonista funcional da atividade das ativinas (Aleman-Muench & Soldevila, 2012; Ciarmela *et al.*, 2011). Duas moléculas de folistatina ligam uma molécula de ativina, bloqueando os seus sítios de ligação aos ActRII e ActRI, ou seja impedindo assim, a ligação das ativinas aos seus receptores da membrana celular (Thompson *et al.*, 2005; Kaneko, 2016b). Contudo, a folistatina também pode se ligar a outros fatores de crescimento da super-família TGF- $\beta$  como a miostatina e certas BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*), indicando que os efeitos atribuídos à superexpressão, ou inibição das folistatinas em tecidos normais e neoplásicos, não podem ser inteiramente atribuídos às ativinas (Bloise *et al.*, 2019b).

A presença da folistatina em tecidos tumorais pode estar relacionada com a sobrevivência das células tumorais na ausência de glicose, devido ao fato de que uma expressão aumentada da folistatina nestes tumores pode regular negativamente a síntese de rRNA e a biogênese de ribossomos e assim manter a homeostase energética celular (Bloise *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2010; Zhang, L. *et al.*, 2018). A presença de folistatina também induz a angiogênese e a proliferação de células tumorais, como reportado em casos de câncer de mama e de próstata (Bloise *et al.*, 2009; Sepporta *et al.*, 2013). Além disso foi demonstrado, que a folistatina favorece a metástase em tumores gástricos e de próstata (Sepporta *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2016), mas tem atividade oposta em tumores sólidos nas gônadas (Shi *et al.*, 2016).

Destaca-se que a expressão de folistatina tem sido usada como marcador para o diagnóstico e o prognóstico de tumores sólidos (Bloise *et al.*, 2009; Sepporta *et al.*,

2013; Shi *et al.*, 2016); a atividade da folistatina está sendo avaliada como agente terapêutico no tratamento de tumores sólidos, com respostas variáveis segundo o tipo de tumor (Shi *et al.*, 2016; Zhang, L. *et al.*, 2018) (Figura 6).

### **1.8 Ação das Ativinas na Infecção e na Inflamação**

Os membros da família TGF- $\beta$  podem controlar o metabolismo, a diferenciação e a proliferação celular, além de ter papel na cicatrização de tecidos e no desenvolvimento embrionário (Hübner *et al.*, 1999; Morianos *et al.*, 2019). As ativinas e seus ligantes podem ser localizados nos distintos órgãos durante o desenvolvimento embrionário, mas a sua síntese diminui na maioria destes sítios ao completar o desenvolvimento (Hübner *et al.*, 1999).

Nas células do sistema imune a Ativina A induz a ativação de macrófagos, aumentando a capacidade de fagocitose e pinocitose dessas células, além de estimular a produção de mediadores inflamatórios (efeito pró-inflamatório. Porém, em macrófagos ativados, a Ativina A produz uma resposta anti-inflamatória, induzindo uma retroalimentação negativa desses eventos (Morianos *et al.*, 2019). A resposta das células dendríticas à Ativina A pode variar segundo o estado de maturação e o micro-ambiente celular. Após o estímulo pelo Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor* - TNF- $\alpha$ ), os neutrófilos são uma fonte de Ativina A, que pode ser um potente ativador das funções dos neutrófilos. A Ativina A induz a uma resposta anti-inflamatória desenvolvida por células da micróglia no sistema nervoso, favorecendo uma resposta contra patógenos (Phillips *et al.*, 2009; Robson *et al.*, 2009; Sideras *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2017; Morianos *et al.*, 2019).

Em linfócitos B, a Ativina A atua somente em células não ativadas e favorece a produção e a liberação de IgG e IgA. Em células T atua ao nível do timo, alterando a maturação de células CD4<sup>+</sup> diferenciando essas em células T Auxiliares (T CD4<sup>+</sup>-*helper*) Foliculares (T<sub>fh</sub>), células que regulam o desenvolvimento da resposta humoral favorecendo a proliferação de células B e sua diferenciação em plasmócitos produtores de anticorpos, e em células B de memória longa. Também induz a expressão de Foxp3 em Células T, permitindo o desenvolvimento de Células T reguladoras, evento que diminuirá a proliferação de células T CD8<sup>+</sup> efetoras (Morianos *et al.*, 2019). Em experimentos *in-vitro* a Ativina A demonstrou ser capaz de

inibir as funções de Células Exterminadoras Naturais (*Natural Killer* – NK) (Rautela *et al.*, 2019).

As ativinas estão envolvidas no desenvolvimento da pele e dos pelos (Munz *et al.*, 2001; Morianos *et al.*, 2019). Na pele de adultos e neonatos não é possível se detectar ativinas, mas após a indução de um dano tecidual as subunidades  $\beta A$  e  $\beta B$  podem ser detectadas, sendo a subunidade  $\beta A$  predominante; mas durante a cicatrização a subunidade  $\beta B$  é a mais predominante (Hübner *et al.*, 1999). Na pele intacta a subunidade  $\beta B$  pode ser detectada na epiderme e na derme, sendo a subunidade  $\beta A$  detectada apenas na derme. A detecção da subunidade  $\alpha$  na pele intacta e com danos é pequena (Munz *et al.*, 2001).

Durante o início de uma lesão os leucocitos Polimorfo-nucleados (PMN) e macrófagos locais expressam as citocinas pró - inflamatórias IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , que podem induzir a expressão de ativinas em queratinócitos e fibroblastos (Hübner *et al.*, 1999). Após o dano da pele há detecção das subunidades  $\beta A$  e  $\beta B$ , mas a detecção da subunidade  $\alpha$  se mantém mais discreta: deduz-se assim, que durante a cicatrização, há maior formação de ativinas e menor formação de inibinas (Munz *et al.*, 2001). Nas etapas iniciais da lesão da pele há maior expressão de ativina, sendo essa um importante modulador do processo de reparação, induzindo a formação do tecido de granulação e a deposição de matriz extra - celular (Munz *et al.*, 2001).

Contudo, a expressão de ativina pode estar relacionada ao processo de fibrose (Hübner *et al.*, 1999). Uma vez que as ativinas também foram reportadas nos processos fibróticos de distintos tecidos como fígado, rins e pulmão (Munz *et al.*, 2001).

Nos rins sem alterações não se observa a expressão de ativinas, mas no processo fibrótico observa-se a expressão das ativinas nas células tubulares, mesangiais e fibroblastos. Na Lesão Renal Aguda (LRA) se sugere que Ativina A inibe a reparação e a regeneração da lesão, após as 24 horas, comparada com Ativina B que tem a mesma função nas etapas iniciais. Na Insuficiência Renal Crônica (IRC) a ativina é um mediador importante da fibrose renal (Mehta & Krepinsky, 2020), pois inibe a diferenciação e a maturação de eritrócitos que desencadeia uma anemia na IRC (Jelkmann, 2018), e induz o Distúrbio do Metabolismo Mineral e Ósseo (DMO) (Sugatani, 2018).



A Ativina A se encontra elevada na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), em pacientes em estado crítico sob a infecção por H1N1 (Linko *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2019). Na resposta alérgica, a Ativina A encontra-se elevada no epitélio pulmonar e em células CD4+ de sangue periférico, onde interage com IL-25 para promover o remodelamento e hiperatividade das vias aéreas (*Airway Hyperreactivity* – AHR), além de induzir a diferenciação de células Th9, as quais promoverão o recrutamento e a ativação de mastócitos no pulmão, e finalmente, potencializar a liberação de IgE em células B (Jones *et al.*, 2012).

No fígado a Ativina A inibe a produção de proteínas de Fase aguda, proteínas que permitem eliminar os patógenos e favorece a resposta inflamatória. Em infecções por *Leishmania major* favorece o desenvolvimento da resposta do tipo Th2 em células dos *nódulos* linfáticos (Morianos *et al.*, 2019).

No dano cerebral a Ativina A tem papel protetor ao induzir um efeito anti-inflamatório; reduz ainda o edema cerebral citotóxico, inibe o agregado de radicais livres, e promove o aumento do número de sinapses (Su *et al.*, 2018). Em situação de meningite, observa-se aumento da produção de ativinas no fluido cérebro - espinhal favorecendo o desenvolvimento de uma resposta anti-inflamatória (Ebert *et al.*, 2010; Morianos *et al.*, 2019). Na encefalopatia tem efeito tanto anti-inflamatório quanto pró-inflamatório, mas em pacientes com hemorragia cerebral a Ativina A está elevada, o que a associa a enfermidades cérebro vasculares (Su *et al.*, 2018).

Em transplantes alógrafos de rins rejeitados (Mehta & Krepinsky, 2020) e pulmões (Westall *et al.*, 2017) a ativina B está elevada no soro sanguíneo e a ativina A elevada na zona de transplante, com macrófagos diferenciados e linfócitos ativados (Mehta & Krepinsky, 2020).

Em infecções e estímulos inflamatórios durante a gravidez, a ativina A favorece a neutralização de patógenos (Jones *et al.*, 2007; Phillips *et al.*, 2009); mas também pode estar correlacionado à interrupção da gravidez em partos prematuros, já que nessa situação, encontra-se altos níveis de ativina A em líquido amniótico e no corio. Em caso de infecções por vírus a ativina A favorece uma resposta anti - viral evitando sua replicação, mas em etapas avançadas da infecção relaciona-se com fibrose e dano tecidual (Morianos *et al.*, 2019). Por último a quantidade de ativina A no soro de pacientes com sepse (Ebert *et al.*, 2010) pode ser usada como indicador da

severidade desse evento (Lee *et al.*, 2016). Portanto, é possível concluir que a ativina A é um importante modulador do sistema imunológico e participa ativamente de eventos inflamatórias em resposta a diferentes estímulos infecciosos em diferentes sistemas, indicando a necessidade do estudo do perfil de expressão das ativinas em diferentes tecidos frente infecção por diversos agentes infectocontagiosos, incluindo os agentes virais.

### **1.9 As Ativinas e o Câncer**

A perda ou acentuação da expressão da ativina A pode alterar os estados proliferativos de distintos tipos de câncer, segundo os tipos celulares e o microambiente celular. Tendo distintas respostas durante as etapas iniciais da oncogênese, as ativinas podem atuar como supressor de tumores. Contudo no câncer em estado de metástases os níveis de ativina A sérica se encontram elevados, demonstrando um possível papel facilitando a metástase tumoral (Reader & Gold, 2015; Couto *et al.*, 2017; Morianos *et al.*, 2019; Bloise *et al.*, 2019b). Nos tumores a interação do sistema ativina - folistatina se relaciona com a angiogênese, metástase e proliferação de tumores sólidos, mas esta interação pode induzir ou inibir a proliferação segundo o tipo celular (Zabkiewicz *et al.*, 2017).

No câncer de pele, excluindo câncer do tipo melanoma, ativina A diminui a atividade de células dendríticas e queratinócitos protegendo contra, e impedindo o desenvolvimento de tumores de pele (Morianos *et al.*, 2019). Contudo, foi demonstrado em um modelo de infecção tegumentar pelo HPV, que a ativina A desempenha um papel permissivo ao desenvolvimento do tumor de pele em camundongos positivos para o HPV8. Porém, essa ação foi dependente da presença de macrófagos pró-tumorigênicos, pois na presença de macrófagos não pró-tumorigênicos a formação do tumor é lenta (Antsiferova *et al.*, 2017). Os melanomas de pele, apresentam uma atividade elevada de ativina A, produzido pelas células tumorais, reduzindo assim o infiltrado de células T CD8 citotóxicas, e favorecendo o desenvolvimento do tumor (Morianos *et al.*, 2019).

No câncer de mama as ativinas inibem o crescimento de células que expressam o receptor de Estrogênio e diminuem a proliferação de células cancerígenas (Kalkhoven *et al.*, 1995). Entretanto, ao mesmo tempo as ativinas aumentam a

Transição epitélio - Mesenquima (*Epithelial Mesenchymal Transition* – EMT), processo no qual as células perdem a polaridade e aderência célula-célula para se tornar células mesenquimais com propriedades migratórias e invasoras, a qual é diminuída pela ação da folistatina (Zabkiewicz *et al.*, 2017). Adicionalmente, as células cancerígenas do Adenocarcinoma ductal do pâncreas produzem ativina A, favorecendo o crescimento tumoral por ação da liberação de LL-37 por parte dos macrófagos (Morianos *et al.*, 2019). Demonstrando que mais estudos são necessários para se melhor entender em quais fases da aquisição de um fenótipo neoplásico, as ativinas funcionam como inibidores ou indutores da progressão da lesão neoplásica.

Recentemente, foi descrito que a ativina A pode induzir efeitos antiproliferativos, proliferativos, ou não exercerem nenhum efeito na proliferação celular. Tais efeitos podem depender da presença ou ausência de outros fatores de crescimento/hormônios no sistema estudado da duração da exposição à ativina A no sistema, e do estágio de diferenciação celular. Neste âmbito, exemplos de efeitos antiproliferativos da ativina A foram descritos em células miometriais, células epiteliais da glândula mamária, na próstata, em unidades formadoras de colônias eritróides, em células endoteliais vasculares, em células SNU-16 de câncer gástrico e hepatócitos. Por outro lado, efeitos proliferativos foram descritos em células de Sertoli, células-tronco trofoblásticas indiferenciadas e citotrofoblastos, células da granulosa, células da hipófise anterior, células progenitoras eritróides, células progenitoras neurais, células  $\beta$  pancreáticas, fibroblastos cardíacos e outros (Bloise *et al.*, 2019). Com relação a Inibina, efeitos proliferativos foram descritos em células do epitélio e estroma prostático (Balanathan *et al.*, 2009), enquanto antiproliferativos do estroma do ovário, células do endométrio (Adu-gyamfi *et al.*, 2020) e células de câncer de mama (Seachrist & Keri, 2019). Já efeitos na proliferação celular da folistatina, foram descritos em células de câncer do pulmão (Chen *et al.*, 2014; Zhang, P. *et al.*, 2018), carcinoma de células basais (Shi *et al.*, 2016) e carcinoma coloretal (Refaat *et al.*, 2016), e antiproliferativos, em células de câncer de mama (Zabkiewicz *et al.*, 2017), melanoma (Shi *et al.*, 2016) e câncer de pâncreas (Togashi *et al.*, 2015). Portanto, como demonstrado, o efeito do sistema Ativina-Inibina-Folistatina sobre a proliferação celular e carcinogênese é bastante complexo, e depende de fatores como o tipo de tumor, o tipo celular, o grau de estadiamento, o status imunológico e infeccioso entre

outros, demonstrando a importância de se estudar a dinâmica da localização tecidual desse sistema em diferentes patologias neoplásicas e em desordens proliferativas.

### **1.10 O sistema Ativina-Inibina-Folistatina no Câncer do colo do útero**

Até o momento, o conhecimento do papel do sistema ativina - folistatina na progressão do câncer do colo do útero é limitado (Adu-gyamfi *et al.*, 2020). Contudo, foi demonstrado que a maior expressão das subunidades  $\beta$ A e  $\beta$ B está relacionada com a progressão das lesões intraepiteliais cervicais, onde a subunidade  $\beta$ A estaria associada à progressão dessas lesões até o câncer do colo do útero, e a subunidade  $\beta$ B estaria mais relacionada com o grau de diferenciação do carcinoma (Jückstock *et al.*, 2010). Contudo, tais estudos foram realizados em um número limitado de participantes e não levaram em consideração, o status infeccioso das lesões pelo HPV e não investigaram o envolvimento da folistatina na progressão dessas lesões.

## 2. Justificativa

Dado às suas diferentes ações na regulação do ciclo celular e na diferenciação em diversos tecidos, o sistema ativina-inibina-folistatina é expresso em vários órgãos. Sendo assim, sua função pode ser tecido-específico e variar significativamente sob diferentes condições fisiológicas ou patológicas. Quando desregulados, os níveis das ativinas e folistatinas podem levar ao desenvolvimento de neoplasias, sendo que suas ações podem ser diferentes de acordo com o tipo, o grau de diferenciação do tumor, e o microambiente celular em que esses tumores se encontram inseridos, isto é, de acordo com o ambiente hormonal e com a presença de infecções e/ou processos inflamatórios.

Entretanto, o padrão de expressão e a localização tecidual de componentes do sistema ativina-inibina-folistatina durante o desenvolvimento do câncer do colo do útero induzido pelo HPV, ainda não foram satisfatoriamente descritos. O entendimento da participação do sistema ativina-inibina-folistatina na progressão do câncer do colo do útero causado pelo HPV auxiliará na compreensão desta neoplasia, que acomete cerca de 530.000 mulheres por ano em todo o mundo (WHO, 2018). Nossa hipótese é a de que a expressão e a localização celular e tecidual de ativina e folistatina se encontram alterados nas distintas etapas da progressão do câncer do colo do útero.

O conhecimento sobre como o sistema ativina-inibina-folistatina atua no desenvolvimento das lesões no epitélio cervical, possui o potencial de impactar positivamente o diagnóstico e o controle da progressão do câncer do colo do útero. Nossa hipótese é a de que a expressão e a localização do sistema ativina-inibina-folistatina se encontram alterados na progressão do câncer do colo do útero. Esse estudo também pode influenciar o desenvolvimento de futuras terapias baseadas em moduladores do sistema ativina-inibina-folistatina, como ferramenta terapêutica para se inibir o crescimento tumoral, e controlar a progressão das Lesões Intra-epiteliais Cervicais ao câncer invasor.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral:**

Avaliar a expressão e a localização tecidual dos componentes do sistema ativina-inibina-folistatina em tecido cervical durante distintas etapas de desenvolvimento do câncer do colo do útero.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- Detectar por PCR, retrospectivamente, a presença do DNA do HPV em amostras de tecidos cervicais.

- Investigar nas amostras positivas a DNA do HPV a presença de DNA do HPV de alto risco-oncogênico.

- Analisar por Imunohistoquímica, o padrão de expressão e a localização celular das proteínas  $\beta$ A-ativina, e do inibidor fisiológico das ativinas, a folistatina em amostras de tecido cervical de pacientes apresentando diferentes estágios de lesões pré - neoplásicas e do câncer do colo do útero.

Correlacionar a expressão e localização celular com a presença e tipo de HPV detectado nas lesões;

## **4. Materiais e Métodos**

### **4.1 Caracterização das amostras e critérios de inclusão**

Neste estudo foi realizada a análise de 162 amostras cervicais incluídas em parafina, obtidas por Biópsias e Cirurgia de Alta Frequência (CAF), que foram selecionadas do banco de amostras teciduais do Laboratório de Anatomia Patológica Tafuri, localizado em Belo Horizonte, MG, e gentilmente cedidas pelo Dr. Alexandre Tafuri, Coordenador do referido laboratório e colaborador do estudo. Destaca-se que tais amostras foram concedidas sob a forma de empréstimo durante o período de realização da pesquisa, ficando sob a guarda provisória do Laboratório de Patogênese Molecular, do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG, mediante a assinatura de um Termo de Biorepositório e de Responsabilidade para a guarda provisória dos blocos de parafina utilizados no presente estudo.

Após a coleta, as amostras de tecido foram processadas rotineiramente para inclusão em parafina, sendo inicialmente realizada a fixação dos tecidos em formalina a 10%, por 24 a 48 horas. As amostras fixadas foram transportadas para o Laboratório de Anatomia Patológica Tafuri, para processamento histológico. Os fragmentos foram submetidos à desidratação gradativa em álcool absoluto, à diafanização em xilol, à inclusão em parafina na temperatura média de 60°C, e à microtomia para confecção de lâminas histológicas coradas por H&E.

O diagnóstico Histopatológico foi independentemente revisado e confirmado por 3 médicos patologistas com larga experiência profissional. Para este estudo foram selecionadas 38 amostras de NIC 1, 37 amostras de NIC 2, 39 amostras de NIC 3 e 33 amostras de Carcinoma de Células Escamosas (CCE) invasor. Quinze amostras cervicais sem alterações histológicas foram incluídas nesse estudo como Controles. Os laudos histopatológicos das pacientes foram disponibilizados para o estudo, dos quais foram extraídos os dados da idade das pacientes e os “achados prévios reportados pelos métodos ginecologistas”.

Destaca-se que para a realização desse trabalho, foram utilizadas amostras cervicais coletadas no período de 2004 a 2006. A utilização destas amostras parafinadas para fins de pesquisa foi aprovada pelo COEP (Comitê em Ética e Pesquisa) da UFMG, em outros estudos anteriores. Para a realização do presente estudo, o projeto de pesquisa foi novamente encaminhado ao COEP – UFMG, para análise do Comitê, e aprovado sob o número CAAE: 55168020.7.0000.5149.

## 4.2 Extração de DNA

A extração dos DNA foi realizada em amostras de tecido cervical incluídas em parafina. Vale ressaltar que antes de obter e processar os cortes histológicos de cada paciente, as navalhas e o micrótomo (HM315R) foram limpos com Xilol, Etanol (100%) e Hipoclorito de sódio (2,5%), para se evitar contaminação cruzada (Greer *et al.*, 1991; Shimizu & Burns, 1995). Para extração de DNA cinco cortes de 10 µm de espessura foram colocados em tubos *ependorff* 1,5 mL para serem desparafinizados com 3 banhos de Xilol a 65°C, seguidos de etapas de centrifugação para sedimentar os tecidos fixados, remover o sobrenadante de xilol e separar a parafina residual. Por último, as amostras de tecido cervical foram submetidas à digestão em banho Maria a 37 °C durante 1 a 7 dias em Tampão de Lise contendo a seguinte composição: 1 µg/µL de proteinase K (solução 500 µg/mL); 0,5 mL de solução NaCl a 1M estéril; 0,5 mL de solução Tris 1M pH 8,0 estéril; 2,5 mL de solução EDTA 0,5M pH 8,0 estéril e 2,5 mL de solução SDS 10% p/v (5g SDS – 50 mL água estéril). O lisado final obtido, contendo proteínas e DNA foi armazenado a -20°C até a sua utilização nas etapas de PCR (Wright & Manos, 1990). A quantificação do DNA presente no lisado foi realizada no espectrofotômetro ND1000 (Thermo Scientific®).

O gene de β-globina humana foi amplificado por PCR para controle da integridade do DNA obtido utilizando-se um protocolo *Hemi-nested* PCR (Saiki *et al.*, 1985), além dos iniciadores GH20 e PC04 na 1ª reação de PCR, e os iniciadores PC03 e PC04 na 2ª etapa do protocolo. Os dois sets de primers permitem a amplificação de fragmentos de 273 pb e de 110 pb do gene de β-globina humana, respectivamente. O volume final de reação foi de 10µl contendo 1µl de DNA extraído de cada amostra de tecido, e 9µl do Mix o qual contém: 0,2 µl (1 UI) de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria-PHT) (5 UI/ µl); 0,5 µl (5 pmoles) de cada iniciador (10 pM/µl de GH20, PC03 e PC04); 0,8 µl (200 µM) de dNTP's (2,5 mM); 1 µl (1X) de tampão PHT-IB (10X) e 6 µl de água bi-destilada estéril. As condições de amplificação foram as seguintes: 1) Desnaturação inicial a 95°C durante quatro minutos; 2) 29 ciclos de 55 °C por um minuto (pareamento), 72 °C por dois minutos (extensão) e 95 °C por um minuto (desnaturação); 3) e um ciclo final de 55 °C por um minuto, 72 °C por dez minutos; e a 4°C por trinta minutos para se manter os produtos de PCR estáveis.



Como controle positivo da amplificação do gene de  $\beta$ -globina humano foram utilizadas amostras de DNA humano extraídas de sangue e/ou tecido cervical. Como controle negativo do PCR, foi preparada uma mistura com todos os componentes da reação (dNTPs, tampão, iniciadores, *Taq* DNA polimerase e H<sub>2</sub>O), sem a adição de qualquer amostra de DNA.

#### 4.3 Detecção da infecção pelo HPV

Para a realização dessa etapa as amostras de DNA extraídas do tecido cervical foram submetidas à amplificação de fragmentos da região *L1* do genoma viral por meio de um protocolo de *Nested-PCR*. Tal protocolo é baseado na amplificação inicial de um fragmento de 450 pb do DNA viral, o qual irá servir como DNA molde para a amplificação do fragmento de 150 pb do genoma viral.

Para a amplificação por PCR do fragmento de 450 pb do genoma viral foram utilizados os iniciadores genéricos para os HPVs – MY11 (5' GCMCAGGGWCATAAYAATGG 3') e MY09 (5' CGTCCMARRGGAWACTGATC 3') (Qu *et al.*, 1997; Molijn *et al.*, 2005), que amplificam o referido fragmento da região de *L1* de diversos tipos de HPV. O volume final de reação foi de 10 $\mu$ l, contendo 1 $\mu$ l de DNA extraído de cada amostra e 9 $\mu$ l do Mix o qual continha: 0,125  $\mu$ l (1,5UI) *Taq* DNA polimerase (Phoneutria-PHT) (5 UI/  $\mu$ l); 1,0  $\mu$ l (5pmoles) de cada iniciador (5 pM/ $\mu$ l); 0,8  $\mu$ l de dNTP's (2,5 mM - Gibco®); 0,4  $\mu$ l de Mg (25 mM); 1  $\mu$ l (1X) de tampão PHT (10X) IB e 4,70  $\mu$ l de água bidestilada estéril. As condições de amplificação foram as seguintes: **1**) desnaturação inicial a 95°C durante quatro minutos, seguida de **2**) 40 ciclos de 55 °C por um minuto (anelamento), 72 °C por dois minutos (extensão) e 95 °C por um minuto (desnaturação), e **3**) um ciclo final de 55 °C por um minuto, 72 °C por 5 minutos e 4°C por 30 minutos para se manter os produtos de PCR estáveis.

A amplificação por PCR do fragmento de 150 pb do gene de *L1* de diversos tipos de HPV, que é interno ao fragmento de 450 pb do genoma viral foi realizada com os iniciadores genéricos para os HPVs – GP5 (5'- TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC C- 3') e GP6+ (5'- GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C- 3') (Qu *et al.*, 1997), que amplificam um fragmento de 150 pb do gene *L1* de diversos tipos de HPV. O volume final de reação foi de 10 $\mu$ l contendo 1 $\mu$ l de DNA da primeira reação e 9 $\mu$ l Mix o qual continha: 1,0  $\mu$ l (10 pmoles) de cada iniciador (10 pM/ $\mu$ l); 0,2  $\mu$ l (1 UI) da *Taq* DNA polimerase (Phoneutria-PHT) (5 UI/  $\mu$ l); 1  $\mu$ l (200  $\mu$ M) de dNTP's (2,5 mM-

Gibco®); 1 µl de tampão PHT IB e 4,8 µl de água bidestilada estéril. As condições de amplificação foram as seguintes: 1) desnaturação inicial a 95°C durante quatro minutos; seguida de 2) 39 ciclos de 95 °C por um minuto (desnaturação), 45 °C por dois minutos (pareamento) e 72 °C por um minuto (extensão); e um ciclo final de 3) 45 °C (pareamento) por dois minutos, 72°C (extensão) por cinco minutos e 4°C por trinta minutos para se manter os produtos do PCR estáveis.

Como controle positivo, o DNA extraído de células HeLa que possuem o genoma do HPV 18 integrado ao seu genoma, e como controle negativo uma mistura de todos os componentes da reação (dNTP's, Tampão, iniciadores, *Taq* DNA polimerase e H<sub>2</sub>O), sem adição de qualquer amostra de DNA.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado pelo método da prata.

#### **4.4 Genotipagem dos tipos de HPV de alto risco**

As amostras cervicais positivas para o DNA do HPV foram submetidas à genotipagem dos HPVs de alto risco: 16, 18, 31, 33, 35, 52 e 58, pelas técnicas de *Hemi-Nested* PCR e de PCR convencional. Para amplificação de um fragmento genérico (306 pb a 343 pb) da região dos genes *E6* e *E7* dos HPVs 16, 18, 31 e 52 foram utilizados o iniciador *E6CF4* (direto) e o iniciador *E7CR3* (reverso) (Yamaguchi *et al.*, 2002), dos quais os amplicons serviriam de DNA molde para a segunda reação de PCR. Após a primeira etapa de amplificação, iniciadores específicos juntamente com o iniciador *E7CR3* (reverso) foram utilizados para amplificação de fragmentos tipo HPV-específicos pela reação de *Hemi-Nested* PCR. Assim, para amplificação de um fragmento de 149 pb do HPV16 foi utilizado o iniciador 16SF (direto), para amplificação de um fragmento de 177 pb do HPV18 foi empregado o iniciador 18SF (direto), para amplificação de um fragmento de 300 pb do HPV31 foi utilizado o iniciador 31SF (direto), para amplificação de um fragmento de 249 pb do HPV52 foi utilizado o iniciador 52SF (direto) e para amplificação do fragmento de 375 pb do HPV58 foi utilizado o iniciador 58SF (direto). Porém, para amplificação de um fragmento de 455 pb do HPV33 foram utilizados os iniciadores 33F e 33R (complementares à região de *E1* e *E2*), e para amplificação de um fragmento de 358 pb do HPV35 foram utilizados os iniciadores 35F e 35R (complementares à região de *E6* e *E7*) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Iniciadores utilizados para detecção do genoma dos HPVs 16,18, 31, 33, 35 e 52

Primer	Alvo	Sequencia de nucleotídeos	HPV	pb	Referencia
E6CF4	E6/E7	5'-ATT CTG TGT ATG GAG AAA CAT TAG AA-3'	HPV-DNA	306 - 343	Yamaguchi et al., 2002
E7CR3	E6/E7	Reverso 5'-TGA GCT GTC GCT TAA TTG CTC-3'	HPV-DNA	306 - 343	Yamaguchi et al., 2002
16SF1	E6/E7	5'-TGT ATG TCT TGT TGC AGA TCA TCA-3'	HPV16	149	Yamaguchi et al., 2002
18SF2	E6/E7	5'-CCA TTC GTG CTG CAA CCG-3'	HPV18	177	Yamaguchi et al., 2002
31SF1	E6/E7	5'-GTA TGG AAC AAC ATT AGA AAA ATT GAC-3'	HPV31	300	Yamaguchi et al., 2002
33F	E1/E2	Direto 5'-ATG ATA GAT GAT GTA ACG CC-3'	HPV33	455	Grce et al., 1997
33R		Reverso 5'-GCA CAC TCC ATG CGT ATC AG-3'			
35F	E6/E7	Direto 5'-CAA CGA GGT AGA AGA AAG CAT C-3'	HPV35	358	Sotlar <i>et al.</i> , 2004
35R		Reverso 5'-CCG ACC TGT CCA CCG TCC ACC G-3'			
52SF2	E6/E7	5'-CTA TTA GAT GTA TGA TTT GTC AAA CG-3'	HPV52	249	Yamaguchi et al., 2002
58SF1	E6/E7	5'- ATG TAA AGT GTG CTT ACG ATT GC-3'	HPV58	375	Yamaguchi et al., 2002

A genotipagem do HPV 33 foi realizada por um protocolo de *Touch-down* PCR (Grce *et al.*, 1997; Camargos, 2015), onde o volume final da reação foi de 10µl, contendo 1µl de DNA de cada amostra e 9µl do Mix o qual continha: 0,20 µl (2UI) de *Taq* DNA polimerase Phoneutria-PHT (5 UI/ µl); 0,5 µl (5 pmoles) de cada iniciador (10 pM/µl); 0,8 µl (200 µM) de dNTP's (2,5 mM - Gibco®); 1 µl de Tampão PHT IB (10X) e 6 µl de água bi-destilada estéril. As condições de amplificação foram as seguintes: 1) Desnaturação inicial a 94°C durante cinco minutos, 2) 4 ciclos de 94 °C por trinta segundos (desnaturação), 57 °C por trinta segundos (anelamento) e 72 °C por um minuto (extensão); seguidos de 3) 34 ciclos de 94 °C por trinta segundos, 55 °C por trinta segundos e 72 °C por um minuto; 4) O ciclo final foi de 94 °C por trinta segundos, 57 °C por trinta segundos, 72 °C por cinco minutos, e 4°C por trinta minutos para se manter os produtos de PCR estáveis.

A genotipagem do HPV 35 foi realizada segundo o protocolo descrito por Sotlar *et al.*, 2004 onde o volume final da reação foi de 10µl continha 1µl de DNA de cada amostra e 9µl do Mix contendo: 0,20 µl (2UI) de *Taq* DNA polimerase Phoneutra-PHT (5 UI/ µl); 1 µl (10 pmoles) de cada iniciador (10 pM/µl); 0,8 µl (200 µM) de dNTP's (2,5 mM - Gibco®); 1 µl de tampão PHT IB (10X) e 5 µl de água bi-destilada estéril. As condições de amplificação foram as seguintes: 1) Desnaturação inicial a 94°C durante cinco minutos seguidos de 2) 30 ciclos de 54 °C por dois minutos (anelamento), 72 °C por um minuto (extensão) e 90 °C por trinta segundos (desnaturação) seguido do ciclo final de 3) 54 °C por dois minutos, 72 °C por 10 minutos e 4°C por 30 minutos para se manter os produtos de PCR estáveis.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, corado pelo método da prata. A presença do fragmento de DNA amplificado foi confirmada no gel, pela comparação visual com os fragmentos do padrão de peso Molecular 1 Kb (Ludwig, UFRGS, Porto Alegre, RS).

#### **4.5 Imunohistoquímica de componentes do sistema Ativina-Folistatina.**

Para a avaliação da expressão e localização das proteínas do sistema Ativina - Folistatina em tecidos cervicais que representam diferentes estágios de progressão do câncer do colo do útero, a técnica de Imunohistoquímica foi conduzida de acordo com o protocolo descrito anteriormente por Bloise *et al.*, (2009 e 2010); Couto *et al.*, (2017); Imperio *et al.* (2018).

Resumidamente, cortes consecutivos de 5 µm de espessura de fragmentos de tecido cervical obtidos em micrótomo (HM315R) foram desparafinizados em 4 banhos de xilol por 5 minutos e reidratados através de uma série graduada decrescente de concentração de etanol (100% a 25%).

Para a etapa de recuperação antigênica, os cortes de tecido foram imersos em tampão citrato de sódio (0,01M) por 30 minutos em banho-maria a 100°C. O tampão citrato de sódio foi escolhido após padronização da etapa de recuperação antigênica, pela realização da comparação da qualidade de marcação obtida com o tampão citrato e o tampão tris - HCL (0.01 M).

O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado com exposição das lâminas à solução de PBS/BSA (2% em PBS) por 1 hora a temperatura ambiente (TA).

##### *4.5.1 Incubação com os anticorpos primários*

Para a análise da imunomarcação da subunidade βA ativina/inibina os cortes foram incubados com o anticorpo primário específico anti- βA ativina/inibina, isotipo Ig-G, monoclonal (E1) produzido em camundongo na diluição de 1:500 (SC 166503; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Essa diluição foi definida após realizarmos a comparação da qualidade de marcação obtida com esse anticorpo em tecido de Carcinoma urotelial do trato urinário superior (Rau *et al.*, 2011).

Para avaliação da produção de folistatina em tecidos cervicais os cortes foram incubados com o anticorpo primário específico anti - folistatina isotipo Ig-G, policlonal à diluição de 1:400 (Ab203131; Abcam. Cambridge, UK). Tal diluição foi definida após

realizar comparação da qualidade de marcação obtida com esse anticorpo à diluição de 1:500 em amostras de ovário com endometriose (Torres *et al.*, 2007) e de 1:200 em distintos tecidos do organismo (WADA *et al.*, 1996).

Neste estudo, a definição da diluição de todos os anticorpos primários foi alcançada após realizar uma curva de diluição e testes de tempo de incubação para a otimização do uso dos anticorpos primários, utilizando-se amostras de tecidos representativas de todos os grupos de Lesão Cervical. Nos experimentos de padronização todas as incubações foram realizadas a 4 °C “*overnight*”.

Após incubação das amostras com o anticorpo primário, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%), sendo as lâminas lavadas em PBS por 60 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente os cortes foram incubados com o anticorpo secundário solução ABC do kit Vector (*Vectastain ABC Kit-PK 6101 ou PK 6102; Vector Laboratories, USA*) por 30 minutos (TA) sendo esta etapa seguida de uma lavagem em PBS, na mesma temperatura.

A revelação do anticorpo secundário foi realizada com Diaminobenzidina (DAB) (*Spring Bioscience*) por 4 minutos (TA). Após a viragem para cor marrom, os cortes foram lavados em água destilada por 10 minutos (TA), e realizada a contra-coloração com Hematoxilina de Harris (Renilab®) por 15 segundos, sendo em seguida lavados em água corrente por 10 minutos (TA), desidratados em série crescente de etanol (70% a 100%), diafanizados em 3 banhos de Xilol de 10 minutos cada (TA). Finalmente as seções de tecido montadas à temperatura ambiente em meio de montagem *Entellan* (Merk Millipore, 3208 20 10, USA).

Apropriados controles positivos e negativos foram incluídos em cada experimento. Cortes histológicos de pacientes com CCE apresentando grande área de lesão foram utilizados como controles positivos. Para os controles negativos das reações o anticorpo primário foi substituído pela solução de bloqueio (2% BSA em PBS).

#### **4.6 Análise da Imunomarcação**

O padrão de expressão e a localização das marcações por Imunohistoquímica foram avaliados por meio de microscopia óptica. A marcação resultante foi avaliada pelo *score* de imunoreatividade (Fedchenko & Reifenrath, 2014) para a  $\beta$ A ativina/inibina, e para a folistatina. Nestas marcações foram consideradas positivas

áreas que apresentaram forte coloração marrom no núcleo e no citoplasma das células cervicais em áreas de lesão Intra-epitelial e de câncer.

O índice de marcação de cada amostra foi determinado por um *escore* final de de 0 a 16 (Fedchenko & Reifenrath, 2014; Burges *et al.*, 2011), que foi obtido pela multiplicação dos valores obtidos para a porcentagem de marcação de células positivas (A: 0-4) e a intensidade da marcação (B: 0-4) (Tabela 2).

Com um microscópio de luz equipado com uma câmera digital, inicialmente, foi realizada uma varredura da lâmina sob a objetiva de 10X, e após a identificação das regiões marcadas foram selecionadas as áreas que correspondiam às lesões intraepiteliais e câncer, as quais foram fotografadas e as imagens armazenadas em arquivos do tipo BMP e TIFF.

**Tabela 2:** Escore de Imunorreatividade da marcação pelos anticorpos primários em amostras cervicais.

A	B	AxB
% de área marcada	Intensidade de marcação	Escore final
0: 0% Celulas Positivas	0: reação negativa	0-1: negativo
1: <10% Celulas Positivas	1: reação leve	2-3: leve
2: 10-50% Celulas Positivas	2: reação moderada	4-8: moderado
3: 51-80% Celulas Positivas	3: reação forte	9-12: forte
4: >80% Celulas Positivas	4: reação muito forte	12-16: muito forte

#### 4.7 Análise Estatística

Todos os resultados foram organizados em tabelas e foi realizada análise descritiva, sendo os dados inicialmente submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. Em seguida foi realizada análise com o método não paramétrico de Kruskal-Wallis, para comparar as medianas do imunoescor obtido para a marcação da subunidade  $\beta$ A ativina/inibina e de folistatina nas camadas do epitélio estratificado da cérvix uterina, e em componentes do estroma dos grupos controle, NIC1, NIC2, NIC3, e CCE. Em seguida foi realizado o teste de comparação múltipla de Dunn's para determinar quais grupos especificamente apresentavam diferença estatística. As análises foram feitas usando o programa estatístico *R statistics* (R Core Team, 2017), sendo os valores de  $p \leq 0,05$  considerados estatisticamente significantes. Os resultados (valores) obtidos foram descritos como mediana  $\pm$  desvio padrão.

## 5. Resultados

### 5.1 Caracterização clínica das pacientes incluídas no estudo

A idade das 162 pacientes incluídas no estudo variou de 17 a 90 anos (média de  $39,2 \pm 15,6$  anos). O grupo CCE mostrou maior variação na faixa etária das pacientes com média de  $50,3 \pm 15,6$  anos, enquanto no grupo de NIC1 a média da faixa etária foi de  $30,85 \pm 10,38$  anos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Média e desvio padrão, mínima e máxima das idades das pacientes nos diferentes grupos analisados.

	Controle (n=15)	NIC 1 (n=38)	NIC 2 (n=37)	NIC 3 (n=39)	CCE (n=33)	Total (n=162)
	Anos	Anos	Anos	Anos	Anos	Anos
Média	36.87 ± 17.02	30.85 ± 10.38	37.6 ± 15.1	37.9 ± 10.6	50.3 ± 15.6	39 ± 15.5
Mínima	17	19	17	19	20	17
Máxima	65	68	81	51	90	90

NIC1: Neoplasia intraepitelial cervical de grau 1, NIC2: Neoplasia intraepitelial cervical de grau 2, NIC3: Neoplasia intraepitelial cervical de grau 3, CCE: Carcinoma de células escamosas, n: número de amostras.

A faixa etária predominante das 162 mulheres incluídas no estudo foi de 17 a 35 anos o que corresponde a 59 pacientes (36,4%). Quando analisamos por grupo, essa mesma faixa etária foi mais prevalente nos grupos controle, com 9 pacientes (60%) e NIC1, com 26 pacientes (68,4%). Nos grupos das lesões mais graves, houve predomínio da faixa etária entre 36 a 50 anos, com 9 (24,3%) casos de NIC2, 8 (20,5%) casos de NIC3 e 11 (33,3 %) casos no grupo de câncer, o que representou 78% das pacientes desse estudo (Tabela 4).

**Tabela 4.** Distribuição da faixa etária das mulheres incluídas no estudo.

Variável	Controle		NIC 1		NIC 2		NIC 3		CCE		Total	
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
17-35	9	60.0%	26	68.4%	14	37.8%	5	12.8%	5	15.2%	59	36.4%
36-50	2	13.3%	6	15.8%	9	24.3%	8	20.5%	11	33.3%	36	22.2%
51-65	4	26.7%	0	0.0%	2	5.4%	1	2.6%	11	33.3%	18	11.1%
66-80	0	0.0%	1	2.6%	1	2.7%	0	0.0%	3	9.1%	5	3.1%
81-90	0	0.0%	0	0.0%	1	2.7%	0	0.0%	1	3.0%	2	1.2%

NIC1: Neoplasia intraepitelial cervical de grau 1, NIC2: Neoplasia intraepitelial cervical de grau 2, NIC3: Neoplasia intraepitelial cervical de grau 3, CCE: Carcinoma de células escamosas, n= número de amostras.

Avaliando o informe clínico prévio reportado pelos médicos ginecologistas, proveniente do diagnóstico citológico e transcrito nos laudos das pacientes, a lesão predominantemente citada foi a lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) com 35 casos

(21,6%). Entretanto, após avaliação histopatológica, 9 (26%) casos foram diagnosticados com lesão de grau mais avançado, variando de NIC2 a câncer. Nos 31 casos cujo informe clínico relatava HSIL, 3 (7,9%) dos casos apresentaram diagnóstico histológico de NIC1, considerada lesão de baixo grau. Entretanto, 26 (83,8%) foram confirmadas pela histologia como lesões de grau avançado.

Destaca-se que dos 12 casos, cuja suspeita clínica baseada no exame citológico era de Carcinoma *in situ*, 9 (75%) foram confirmadas histologicamente como Carcinoma *in situ* (Tabela 5).

**Tabela 5.** Distribuição do tipo de lesão reportada no informe clínico prévio à análise histopatológica das amostras do colo do útero.

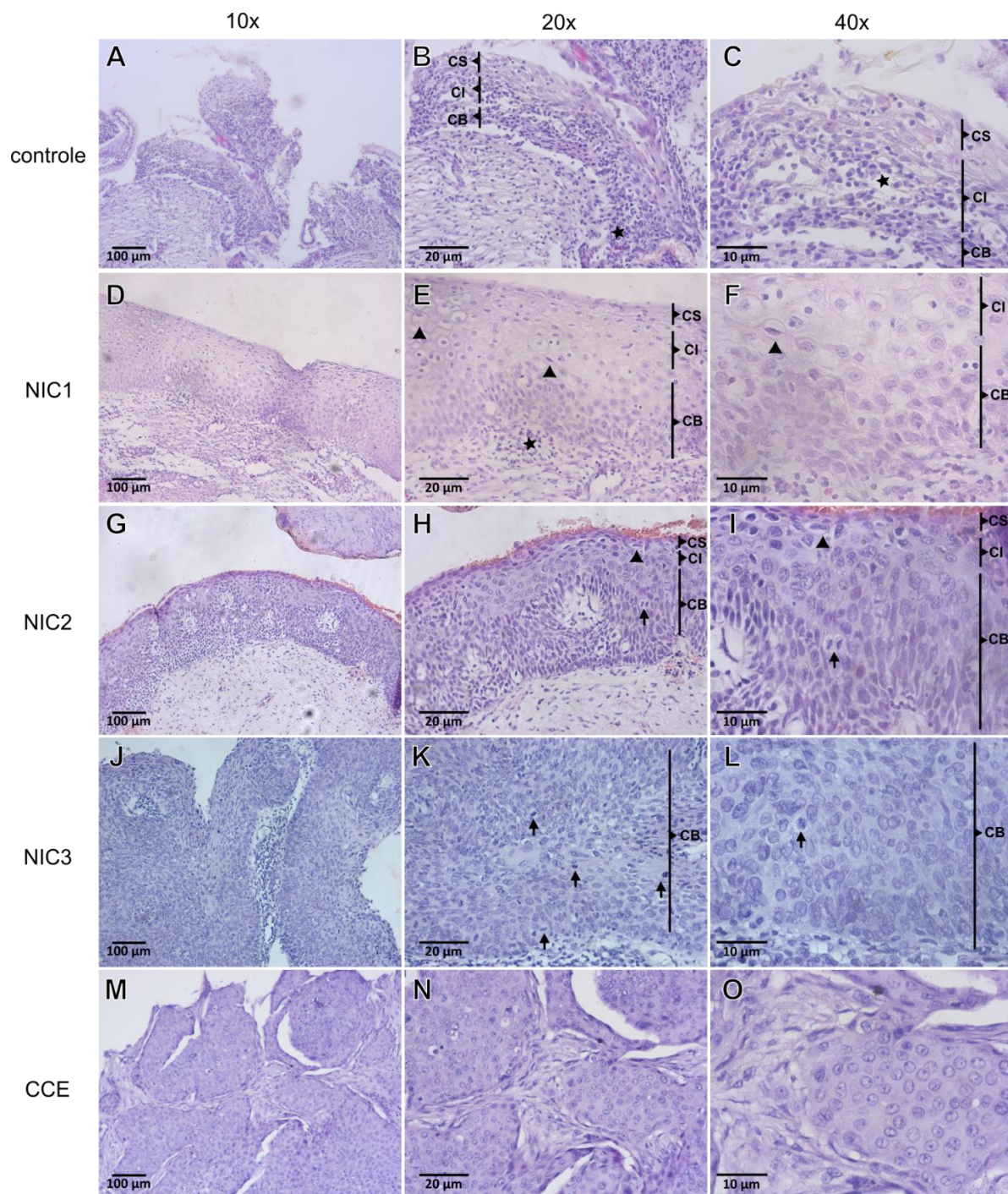
Variável	Controle		NIC 1		NIC 2		NIC 3		CCE		Total	
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
Inflamação	0	0.0%	2	5.3%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	2	1.2%
Não informado	2	13.3%	9	23.7%	14	37.8%	28	71.8%	6	18.2%	59	36.4%
Exérese	0	0.0%	0	0.0%	1	2.7%	1	2.6%	0	0.0%	2	1.2%
Colposcopia Negativa	4	26.7%	1	2.6%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	5	3.1%
ASC-US	0	0.0%	3	7.9%	1	2.7%	0	0.0%	1	3.0%	5	3.1%
LSIL	7	46.7%	20	52.6%	5	13.5%	2	5.1%	1	3.0%	35	21.6%
HSIL	2	13.3%	3	7.9%	14	37.8%	7	17.9%	5	15.2%	31	19.1%
Carcinoma in-situ	0	0.0%	0	0.0%	2	5.4%	1	2.6%	9	27.3%	12	7.4%
Carcinoma invasor	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	11	33.3%	11	6.8%

Atipias de células Escamosas de Significado Indeterminado (ASC-US); Lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL); Lesão intraepitelial de alto grau (HSIL).

## 5.2 Análise histopatológica

Para este estudo, as 162 amostras de tecido cervical foram previamente diagnosticadas por médicos patologistas do Laboratório de Anatomia Patológica Tafuri, responsável pela guarda permanente das amostras. Contudo, todas as amostras foram reavaliadas de maneira independente por três experientes patologistas, para a confirmação do diagnóstico. Foram incluídos nesse estudo todos os casos que tiveram no mínimo 2 diagnósticos coincidentes.



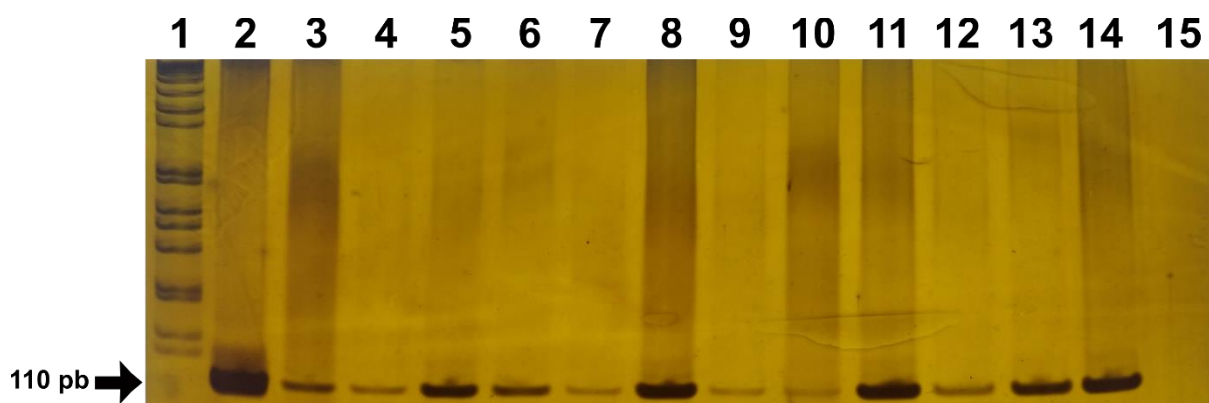


**Figura 7. Cortes histológicas das amostras dos grupos controle, neoplasia intraepitelial cervical de grau (NIC) 1, 2 e 3 e câncer do colo do útero corados com hematoxilina-eosina (H&E).** Imagens obtidas em fotomicroscópio em aumentos de 100x, 200x e 400x respectivamente. No grupo controle (**A–C**) se observa leve infiltrado inflamatório (asterisco) e ausência de atipias celulares. No grupo NIC1 (**D–F**) se observa alteração celular no primeiro terço do epitélio, com distúrbios na maturação e aumento de tamanho dos núcleos, além de presença coilocitos nas camadas intermediária e superficial do epitélio (ponta de seta). No grupo NIC2 (**G–I**) se observa distúrbio da maturação com aumento do tamanho dos núcleos em até dois terços inferiores do epitélio, assim como presença de raros coilocitos (ponta de seta) e figuras de mitose (seta) na camada intermediária. O grupo NIC3 (**J–L**) apresenta distúrbios da maturação e alterações nucleares ao longo de toda a extensão de epitélio, constituído apenas por células imaturas, além de perda da polaridade e figuras mitóticas (seta). No grupo de CCE (**M–O**) se observa presença de massa de tecido epitelial com evidentes alterações nucleares e/ou citoplasmáticas, invadindo o tecido conjuntivo subjacente.

Baseados nos critérios morfológicos proposto por Richart (1967), as lesões foram classificadas baseadas nos seguintes achados morfológicos: as amostras classificadas como NIC1 apresentaram proliferação de células imaturas com perda da polaridade e discretas atipias nucleares restritas ao 1/3 do epitélio, assim como atipias coilocitóticas de grau leve a moderado em células da camada superficial e intermediária. Amostras classificadas como NIC2 mostraram proliferação de células com característica de imaturidade, perda da polaridade e moderada atipia celular atingindo até 2/3 da extensão do epitélio. Os casos de NIC3 caracterizavam-se pela presença de proliferação de células imaturas atingindo toda a espessura do epitélio, além de intensas atipias nucleares e figuras de mitose presentes em toda a extensão do tecido epitelial. Nas amostras de câncer observou-se proliferação de células epiteliais atípicas invadindo o estroma adjacente, formando blocos e cordões sólidos, além de zonas de necrose, e dependendo do grau de diferenciação, podendo ainda apresentar focos de ceratinização ao longo de toda a massa tumoral. Imagens representativas de cortes de tecido cervical normal e patológico apresentando os diferentes diagnósticos histopatológicos estão ilustradas na Figura 7.

### 5.3 Verificação da integridade do DNA extraído das amostras cervicais

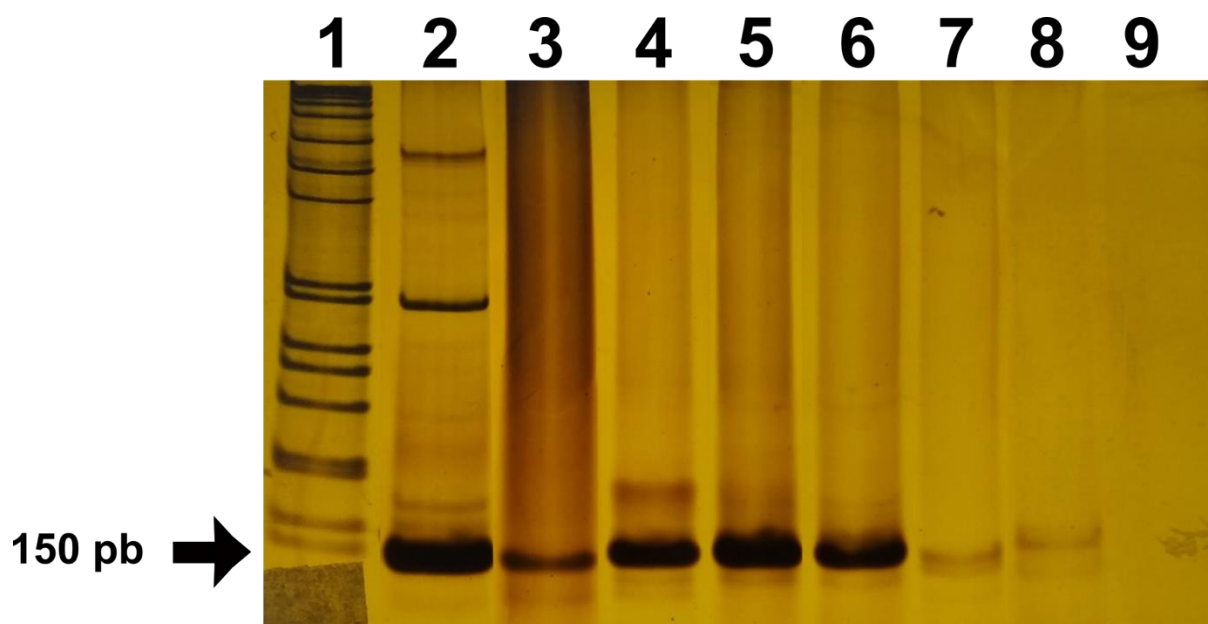
Para avaliar a integridade do DNA extraído das amostras de tecido cervical realizou-se a amplificação de um fragmento de 110 do gene de  $\beta$ -globina humana por um protocolo de *Hemi-Nested PCR* (Saiki *et al.*, 1985). Todas as 162 amostras dos distintos grupos apresentaram resultado positivo para a análise da integridade do DNA extraído (Figura 8).



**Figura 8.** Amplicon de 110 pb do gene de  $\beta$ -globina humano nas amostras cervicais. Gel de poliacrilamida a 6% corado pelo nitrato de prata, **Canaleta 1:** padrão utilizado de 1kb Ladder (Ludwig Biotec®); **Canaleta 2:** controle positivo da reação (DNA extraído de cultura de células *SiHa*); **Canaletas 3 a 14:** produtos da PCR obtidos das amostras positivas para o gene de  $\beta$ -globina Humano; **Canaleta 15:** controle negativo da reação (componentes da PCR sem DNA adicionado).

#### 5.4 Detecção do DNA viral do HPV

Após a detecção da presença do gene de  $\beta$ -globina humana as amostras foram submetidas à detecção do DNA do HPV, utilizando-se o protocolo de *Nested PCR*. Esse protocolo é baseado em duas etapas de PCR consecutivas, que se inicia pela amplificação de um fragmento de 450 pb do gene conservado *L1* utilizando os iniciadores MY09/MY11 genéricos para todos os tipos de HPV. A segunda etapa consistiu na amplificação de um fragmento de 150 pb interno ao primeiro produto utilizando-se os iniciadores GP05+/GP06+ do genoma viral (Figura 9).



**Figura 9. Amplificação do gene L1.** Gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata, representativo apresentando o amplicon de 150 pb do gene *L1* a partir de amostras cervicais. **Canaleta 1:** padrão de Peso Molecular 1Kb DNA Ladder; **Canaleta 2:** controle positivo da reação (DNA extraído de cultura de células SiHa); **Canaletas 3 a 8:** produtos da PCR obtidos das amostras que apresentaram amplificação positiva com os iniciadores GP5 / GP6+; **Canaleta 9:** controle negativo da reação (componentes da PCR sem DNA adicionado).

Em relação à amplificação do fragmento viral de 150 pb do gene *L1*, nas 15 amostras de mucosa cervical normal sem alteração histopatológica (controles), não houve positividade para o DNA do HPV (dados não mostrados).

**Tabela 6.** Detecção do DNA do HPV por *Nested-PCR* nas amostras de tecido cervical.

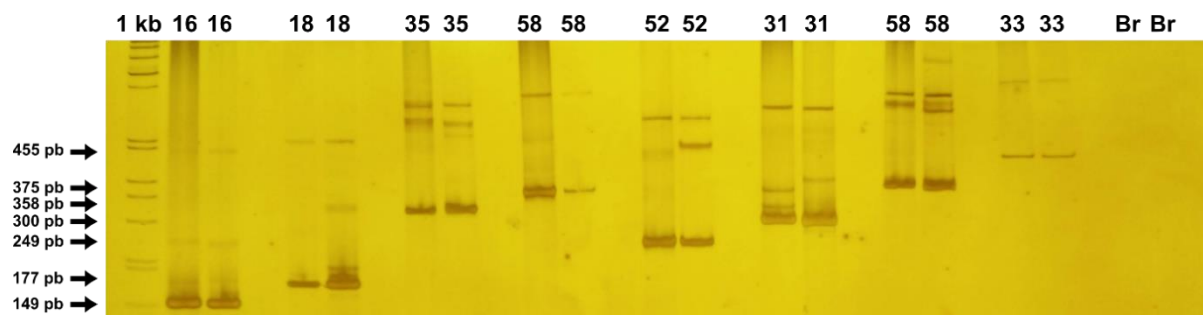
	Controle	NIC 1	NIC 2	NIC 3	CCE	Total
	N	N	N	N	N	N
HPV	(% Resultado)	(% Resultado)	(% Resultado)	(% Resultado)	(% Resultado)	(% Resultado)
Positivo	0 (0%)	14 (46.7%)	18 (52.9%)	27 (75%)	29 (90.6%)	88 (59.9%)
Negativo	15 (100%)	16 (53.3%)	16 (47.1%)	9 (25%)	3 (9.4%)	59 (40.1%)
Total	15 (10,2%)	30 (20.4%)	34 (23.1%)	36 (24.5%)	32 (21.8%)	147 (100%)

HPV: Papilomavirus Humano; NIC 1: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1; NIC 2: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 2; NIC 3: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3; n: quantidade de amostras.

A taxa de positividade total do DNA-HPV nas amostras de tecido cervical analisadas foi de 60% (88/147). Dentro do grupo de amostras classificadas como NIC I, 46,7% (14/30) das amostras foram positivas para a amplificação do gene viral, enquanto em torno de 50% delas foram negativas. No grupo de NIC II, 52,9% (18/34) das amostras apresentaram o DNA do HPV, enquanto 47% foram negativas para o DNA do vírus. Considerando as amostras de NIC III, 75% (27/36) das amostras foram positivas para o HPV e 25% foram negativas. No grupo câncer a positividade foi de 90,6% das amostras (29/32), com apenas 9,3% negativas. No presente trabalho 15 amostras foram inconclusivas para detecção de DNA do HPV (Tabela 6).

### 5.5 Detecção de genótipos do HPV

No presente estudo realizou-se nas amostras cervicais analisadas a pesquisa do DNA dos HPVs de alto risco, tipo 16 e 18, 31 e 52 pela técnica de *Hemi-Nested PCR*. Protocolos convencionais de PCR foram utilizados para detecção dos HPVs 33, 35, 45 e 58. A Figura 10 representa os produtos de PCR obtidos pela amplificação de fragmentos dos genes E6 e E7 dos HPVs testados.



**Figura 10: Gel de Poliacrilamida a 6% corado pelo Nitrato de Prata, representativo da amplificação dos fragmentos virais dos HPVs: HPV 16 (149 pb), 18 (179 pb), 31 (300 pb), 33 (455 pb), 35 (358 pb), 52 (249 pb) e 58 (375 pb); os fragmentos foram respectivamente, amplificados a partir de amostras cervicais positivas para cada tipo.**

Em relação à prevalência dentre as amostras HPV positivas genotipadas (132), 45% foram positivas para HPV16, dessas apenas 10% correspondiam as amostras classificadas como NIC I, para os casos classificados como NIC2, NIC3 e câncer a positividade foi de 52,6%, 59,4% e 55% respectivamente. Os seguintes HPV mais prevalentes foram HPV18 e HPV31 que apresentaram prevalência de 17% e 11% respectivamente. Os genótipos dos HPVs 18 e 45 foram encontrados em todos os grupos de amostras (Tabela 7).

**Tabela 7:** Genotipagem dos HPVs detectados nas amostras de tecido cervical

Grupos	NIC 1	NIC 2	NIC 3	CCE	Total
HPV	n	n	n	n	n
	% grupo	% grupo	% grupo	% grupo	% grupo
HPV 16	3	10	19	22	54
	10,0%	52,6%	59,4%	55,0%	44,6%
HPV 18	5	1	10	5	21
	16,7%	5,3%	31,3%	12,5%	17,4%
HPV 31	8	-	1	5	14
	26,7%	-	3,1%	12,5%	11,6%
HPV 33	3	-	-	-	3
	10,0%	-	-	-	2,5%
HPV 35	2	1	-	2	5
	6,7%	5,3%	-	5,0%	4,1%
HPV 45	5	3	2	2	12
	16,7%	15,8%	6,3%	5,0%	9,9%
HPV 52	3	4	-	4	11
	10,0%	21,1%	-	10,0%	9,1%
HPV 58	1	-	-	-	1
	3,3%	-	-	-	0,8%
Total	30	19	32	40	121
	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

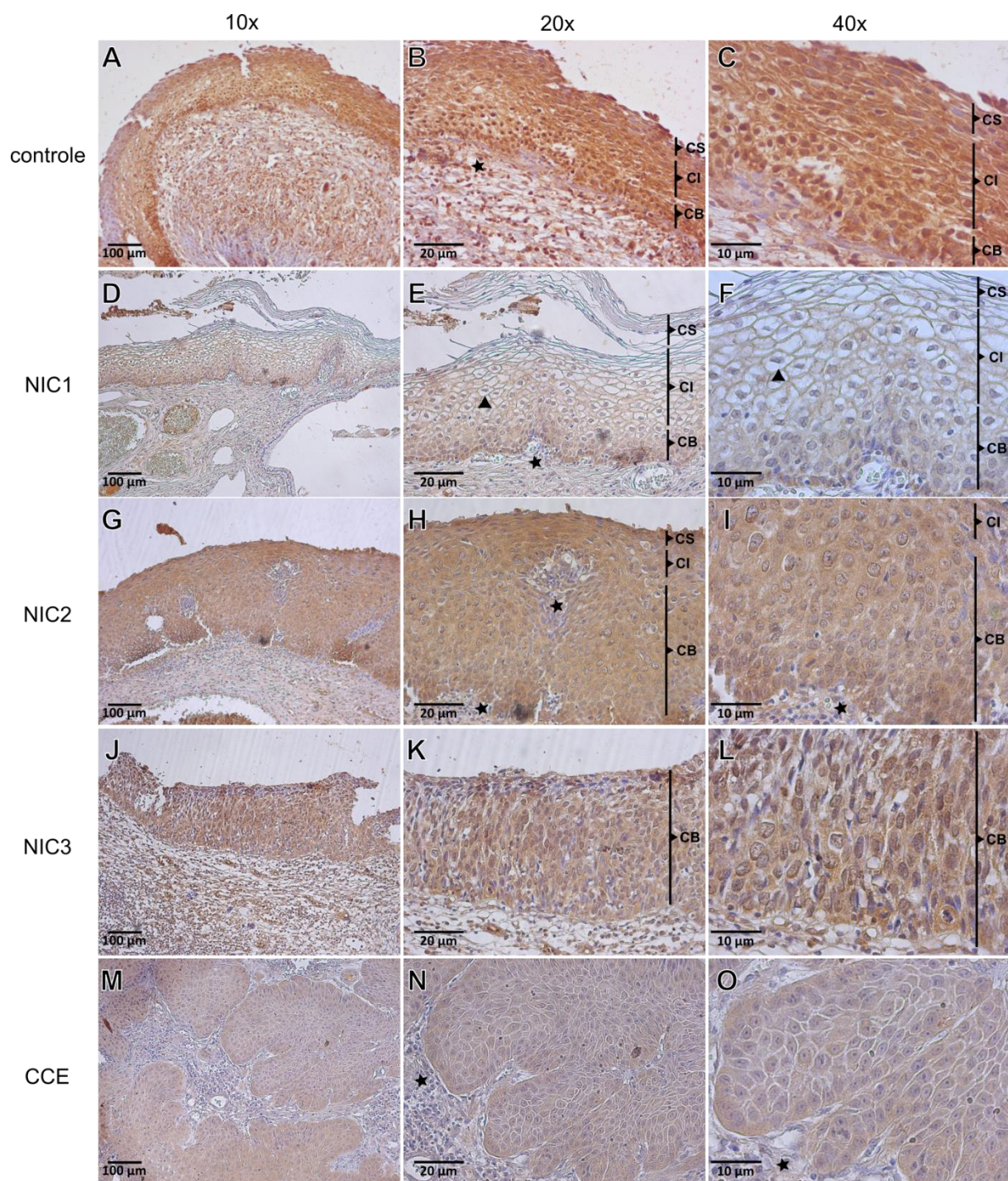
NIC 1: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1; NIC 2: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 2; NIC 3: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3; n: número de amostras genotipadas por grupo de estudo. % do grupo: % das amostras positivas no referido grupo..

### **5.6 Expressão e localização da subunidade $\beta$ A ativina/inibina e folistatina em desordens proliferativas do colo uterino humano.**

A expressão da subunidade  $\beta$ A foi detectada em todo o epitélio cervical estratificado composto por pela camada basal (CB), camada intermediária (CI) e

camada superficial (CS), assim como nos componentes estromais do tecido cervical, nos diferentes estágios da progressão do câncer do colo do útero (Figura 11, painéis A-M).

No grupo controle, a imunomarcagem da subunidade  $\beta$ A estava presente no citoplasma e no núcleo de todas as camadas epiteliais e nos componentes do estroma (Figura 11 B-C). Em NIC1, a coloração citoplasmática da subunidade  $\beta$ A foi mais intensa nas camadas basal, intermediária e superficial do epitélio (Figura 11 D-F). Em NIC2, a imunomarcagem citoplasmática foi maior nas camadas basal e superficial, nos vasos sanguíneos e células inflamatórias do estroma. Em NIC3, a imunomarcagem citoplasmática foi maior em todo o epitélio cervical (indicado como CB na Figura 11 K-L), assim como em vasos sanguíneos e células inflamatórias. No CCE, a imunomarcagem citoplasmática foi observada nos “ninhos” de células neoplásicas que invadem o estroma, assim como nos vasos sanguíneos e células inflamatórias. Por outro lado, em NIC1, a imunomarcagem nuclear foi evidente na camada basal (Figura 2 A-L).



**Figura 11. Expressão da subunidade  $\beta A$  nas amostras de colo de útero nos grupos controle, Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) de grau 1, 2 e 3 e carcinoma cervical escamoso (CCE).** Imagens obtidas em fotomicroscópio em aumentos de 100x, 200x e 400x respectivamente. No grupo controle (**A-C**) foi observada uma forte marcação para subunidade  $\beta A$  no núcleo e no citoplasma. No grupo NIC1 (**D-F**) foi observada uma imunomarcção citoplasmática forte e marcação nuclear leve. No grupo NIC 2 (**G-I**) observa-se marcação citoplasmática moderada e marcação nuclear leve. No grupo NIC3 (**J-L**) imunomarcção citoplasmática forte e marcação nuclear leve. No grupo CCE (**M-O**) uma imunomarcção leve no citoplasmática e no núcleo. CS: Camada superficial; CI: Camada intermediária; CB: Camada basal; \*:Infiltrado inflamatório;  $\uparrow$ : Mitoses



Em seguida, avaliamos o escore de imunomarcção da subunidade  $\beta A$  em diferentes grupos (Figura 12). O escore de imunomarcção citoplasmático e nuclear geral no grupo controle foi semelhante; entretanto, o escore de imunomarcção citoplasmático nos grupos NIC1, NIC, NIC3 e CCE foi em geral maior que o nuclear. Na camada basal, o escore de imunomarcção citoplasmático da subunidade  $\beta A$  em NIC1, NIC2 e CCE ( $p=0,05$ ) foi menor em relação ao grupo Controle. Da mesma forma, o escore de imunomarcção nuclear da subunidade  $\beta A$  em NIC1, NIC2, NIC3 e CCE ( $p=0,05$ ) foi menor em comparação ao grupo Controle. Na camada intermediária de NIC1, encontrou-se menor escore de imunomarcção citoplasmática e nuclear ( $p<0,01$ ) da subunidade  $\beta A$ , em comparação ao grupo Controle. Na camada superficial, o escore de imunomarcção citoplasmática e nuclear foi menor nos grupos NIC1 e NIC2 ( $p=0,05$ ) em relação ao controle.

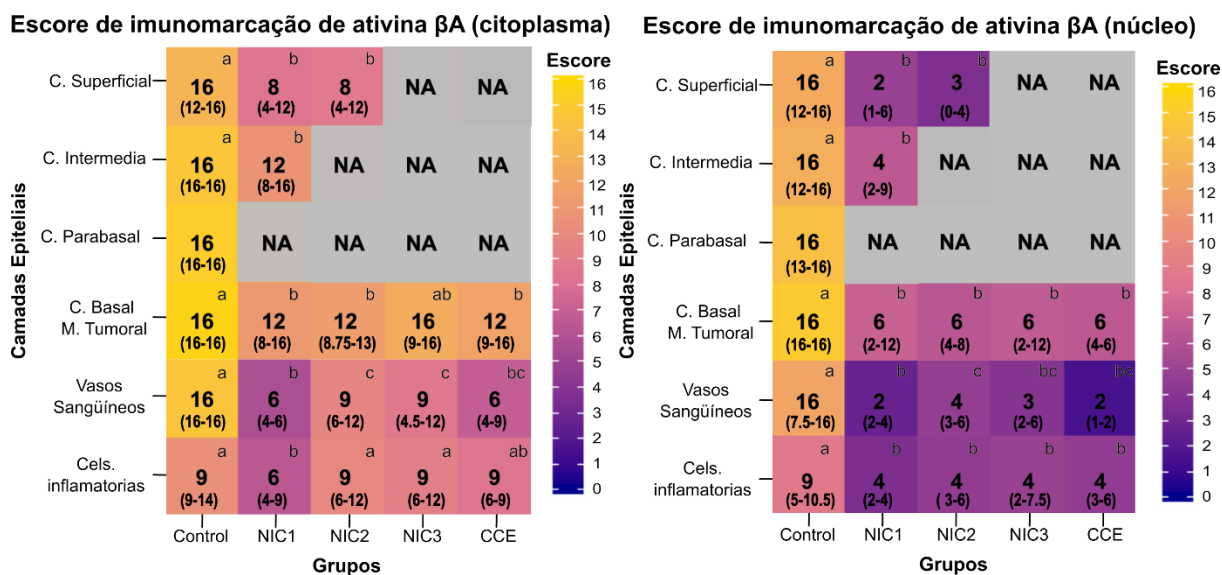
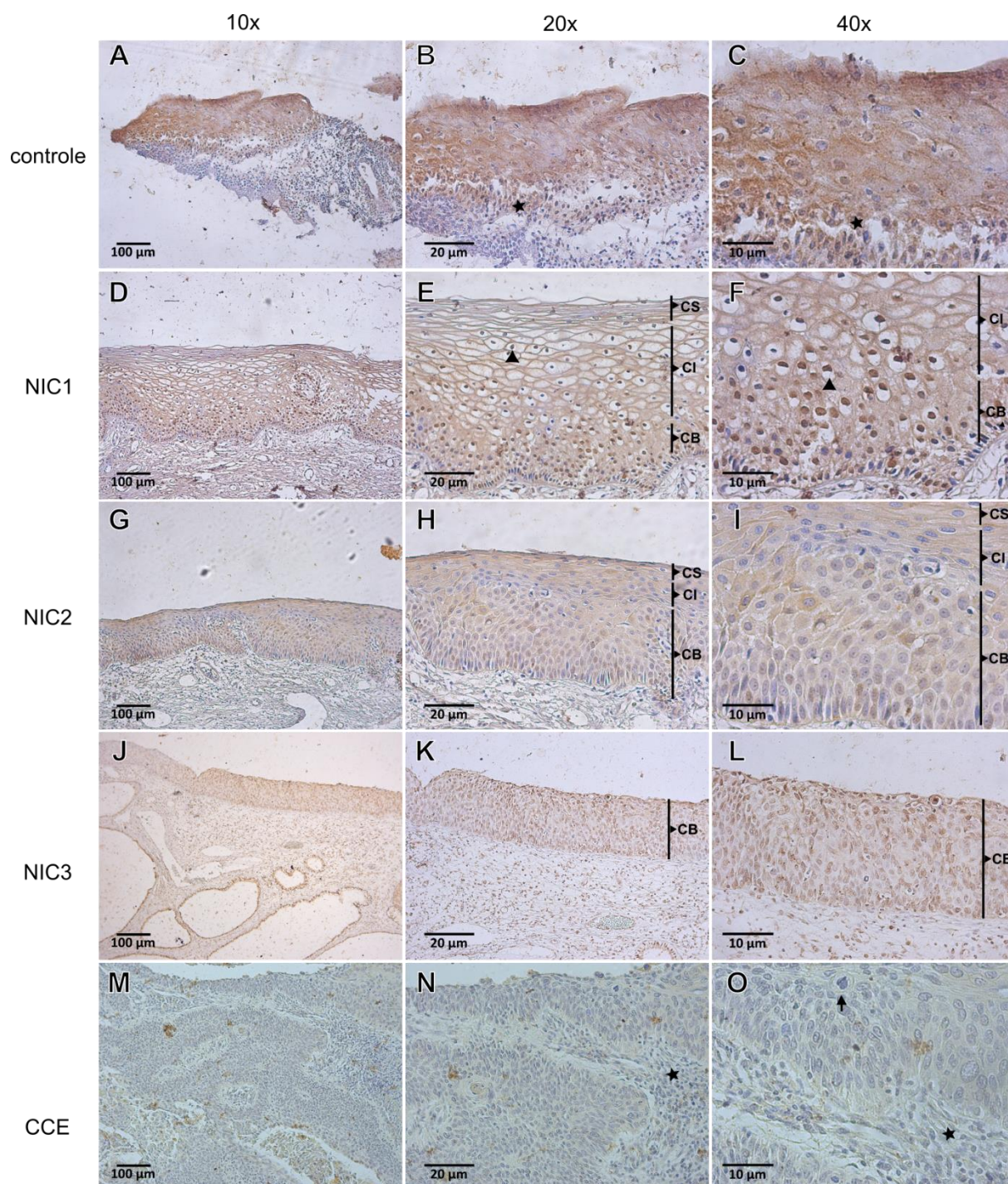


Figura 12. **Escores de imunomarcção da subunidade ativina/inibina  $\beta A$  no citoplasma e no núcleo nas distintas camadas do epitélio do colo do útero em diferentes etapas da progressão do câncer do colo do útero.** Dados apresentados indicam as medianas e os intervalos interquartis entre parêntesis. Cores mais escuras indicam menor imunomarcção de subunidade ativina/inibina  $\beta A$  e cores mais claras indicam maior imunomarcção de folistatina. A diferença entre grupos foi realizada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunn, onde letras diferentes entre grupos da mesma camada indica diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ). NA indica valores não avaliados. As células coradas na massa tumoral no grupo (CCE) foram comparadas com as células da camada basal do grupo controle e NICs 1-3. C=camada; V=vaso; NIC=Neoplasia Intraepitelial Cervical; CCE= carcinoma cervical escamoso.

Nos vasos sanguíneos, o escore de imunomarcção citoplasmática e nuclear foi menor nos grupos NIC1, NIC2, NIC3 e CCE ( $p=0,05$ ) em comparação ao Controle. Com relação ao escore de imunomarcção citoplasmática nos infiltrados de células inflamatórias, observou-se menor marcação em NIC1 comparado aos grupos Controle e NIC2 ( $p=0,001$ ), enquanto a imunomarcção nuclear da subunidade  $\beta A$  em

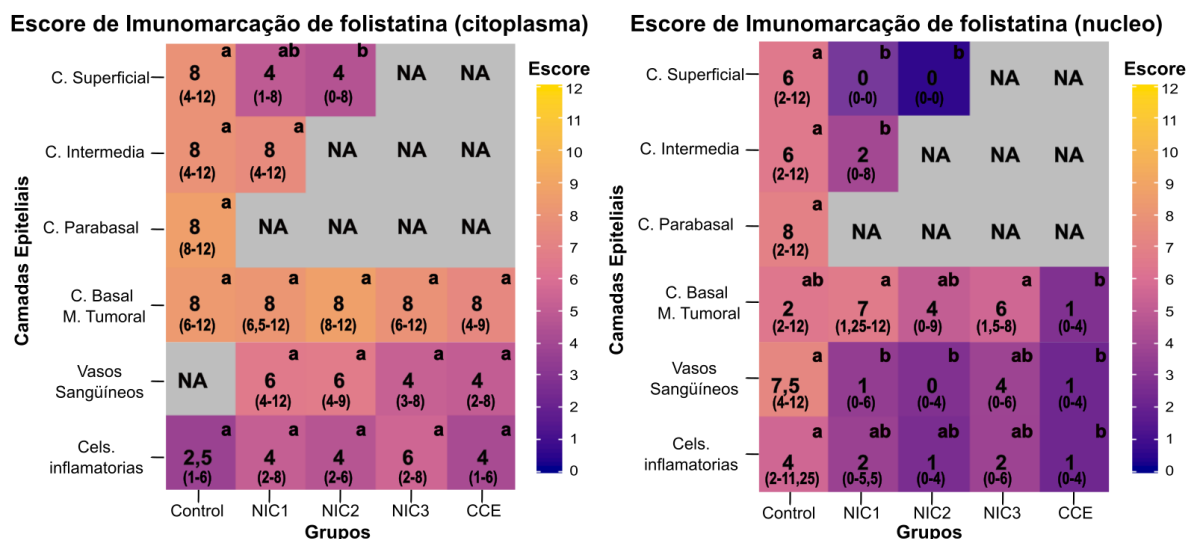
infiltrados inflamatórios foi menor em NIC1, NIC2, NIC3 e CCE ( $p < 0,05$ ) que no grupo Controle.

A folistatina foi detectada em todas as camadas do epitélio cervical, bem como nos componentes do estroma das amostras cervicais - do grupo Controle até todos os estágios de progressão para CCE (Figura 4). No grupo Controle, a imunocoloração da folistatina foi maior no citoplasma de todas as camadas do epitélio estratificado. Já a marcação nuclear da folistatina foi maior nas camadas parabasal, intermediária e superficial do epitélio escamoso, bem como nos vasos sanguíneos. No grupo NIC1, a imunomarcação citoplasmática da folistatina foi maior na camada basal, intermediária e vasos sanguíneos, enquanto a coloração nuclear foi maior na camada basal. No grupo NIC2, o escore de imunomarcação citoplasmática foi maior na camada basal, epitélio colunar e vasos sanguíneos, porém o escore de imunomarcação nuclear foi maior apenas na camada basal. No grupo NIC3, a marcação citoplasmática foi maior na camada basal e nas células inflamatórias. A folistatina nuclear foi maior na camada basal. Nos tecidos do grupo CCE, a imunomarcação citoplasmática da folistatina foi maior na camada basal, enquanto a marcação nuclear foi menor (Figura 13).



**Figura 13. Expressão da folistatina nas amostras de colo de útero nos grupos controle, NIC 1, 2 e 3 e CCE.** Imagens obtidas em fotomicroscópio em aumentos de 100x, 200x e 400x respectivamente. No grupo controle (A –C) observa-se forte imunomarcção para folistatina no citoplasma e imunomarcção forte a moderada no núcleo. No grupo NIC1 (D-F) imunomarcção para folistatina forte a moderada no citoplasma, e imunomarcção para folistatina moderada no núcleo. No grupo NIC2 (G-I) imunomarcção para folistatina moderada no citoplasma, e de leve a moderada no núcleo. No grupo (J-L) imunomarcção para folistatina moderada no citoplasma e no núcleo. No grupo de câncer (M-O) imunomarcção para folistatina moderada no citoplasma e leve no núcleo das células epiteliais. CS: Camada superficial; CI: Camada intermediária; CB: Camada basal; \*: Infiltrado inflamatório; ↑ : Mitoses.

Em comparação com o grupo Controle, não foram identificadas diferenças no escore de imunomarcção citoplasmática da folistatina na camada basal (Figura 14). No entanto, a folistatina nuclear foi diminuída no CCE em comparação ao NIC1 e NIC3 ( $p < 0,001$ ). Na camada intermediária, a imunomarcção nuclear foi menor no NIC1 em relação ao grupo Controle ( $p = 0,045$ ). Na camada superficial, o escore de imunomarcção citoplasmática e nuclear da folistatina foi menor em NIC2 em relação ao grupo Controle ( $p < 0,05$ ), enquanto o escore de imunomarcção nuclear no NIC1 foi menor em relação ao grupo Controle ( $p < 0,05$ ). Além disso, a folistatina nuclear dos vasos sanguíneos foi diminuída em NIC1, NIC2 e CCE em comparação com o grupo Controle ( $P < 0,05$ ). Por fim, ao se comparar o escore de imunomarcção nuclear da folistatina de células inflamatórias, observou-se que o escore de imunomarcção nuclear do CCE ( $p = 0,037$ ) foi menor que no grupo Controle.

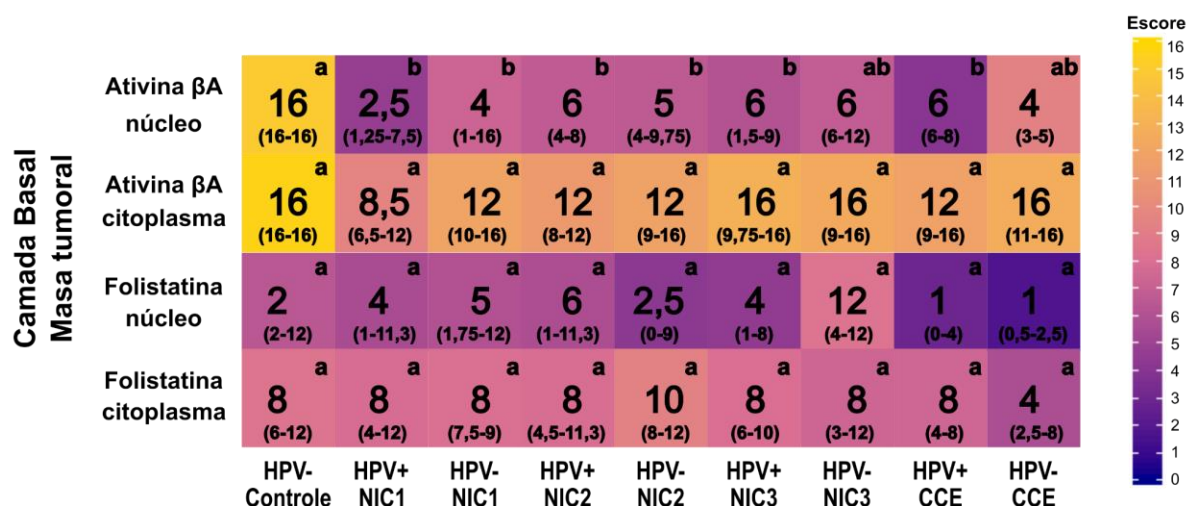


**Figura 14. Escores de imunomarcção de folistatina em núcleo e citoplasma nas distintas camadas do epitélio do colo do útero em diferentes etapas da progressão do câncer do colo do útero.** Dados apresentados indicam as medianas e os intervalos interquartis entre parêntesis. Cores mais escuras indicam menor imunomarcção de folistatina e cores mais claras indicam maior imunomarcção de folistatina. A diferença entre grupos foi realizada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunn, onde letras diferentes entre grupos da mesma camada indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). NA indica valores não avaliados. As células coradas na massa tumoral no grupo (CCE) foram comparadas com as células da camada basal em Controle e NICs 1-3. C=camada; V=vaso; NIC=Neoplasia Intraepitelial Cervical; CCE= carcinoma cervical escamoso.

Finalmente, comparamos o escore de imunomarcção da subunidade  $\beta A$  e da folistatina na camada basal/massa tumoral em grupos HPV positivos e HPV negativos nos diversos estágios de progressão das lesões cervicais (figura 15). O escore de

imunomarcção nuclear da subunidade  $\beta$ A do grupo controle foi maior comparado com todos os grupos HPV positivo (NIC1-CCE;  $p < 0,05$ ) e com os grupos HPV negativo em NIC1 e NIC2 ( $p < 0,05$ ). Porém não foi diferente quando comparado aos grupos HPV negativos NIC3 e CCE. Não encontramos diferenças entre os grupos quando comparamos a marcação citoplasmática de  $\beta$ A e nuclear e citoplasmática de folistatina.

### Escore de imunomarcção em amostras positivas e negativas a HPV



**Figura 15. Comparação dos escores de imunomarcção nuclear e citoplasmática da subunidade  $\beta$ A e de folistatina nos grupos HPV positivos e negativos nas diferentes etapas da progressão do câncer cervical.** Dados apresentados indicam as medianas e os intervalos interquartis entre parêntesis. Cores mais escuras indicam menor imunomarcção de subunidade  $\beta$ A e folistatina, cores mais claras indicam maior imunomarcção. Para se avaliar se existiam possíveis diferenças entre grupos, foi realizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunn, onde letras diferentes entre grupos da mesma camada indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

## 6. Discussão

Na presente tese, foi investigado o padrão de localização e expressão da subunidade  $\beta$ A ativina/inibina e da folistatina durante as distintas etapas de desenvolvimento do câncer do colo do útero (NIC1, NIC2, NIC3) e no CCE, majoritariamente, induzidos pela infecção pelo HPV.

Ao se comparar as médias das idades das pacientes incluídas no estudo, observou-se que a média da idade das pacientes aumentava conforme a severidade da lesão cervical. Esses resultados estão de acordo com o estudo realizado por Aleksioska-Papestiev et al., 2018, que observou que pacientes com câncer de colo do útero apresentavam uma idade superior quando comparados com pacientes portadoras de NIC. Neste aspecto, no presente estudo, a média de idade do grupo câncer foi de  $50.3 \pm 15,6$  anos, similar ao reportado por Aleksioska-Papestiev et al., 2018 e Alemany et al., 2014, onde as idades médias das pacientes à época do diagnóstico de câncer do colo do útero foram de 44,4 e 51,2 anos respectivamente. Juntos esses dados demonstram que o diagnóstico de câncer de colo de útero é mais frequente em mulheres após os 40 anos, e que o mesmo pode ter se desenvolvido ao longo da vida reprodutiva.

Com relação as lesões intra-epiteliais cervicais, mulheres da faixa etária de 17 a 35 anos apresentaram maior predomínio da lesão NIC1 (68,4%) enquanto que em aquelas da faixa etária acima de 35 anos, há predomínio de câncer do colo do útero (66,6%). Gaspar, 2013 comparou a faixa etária com o tipo de lesão observada no colo do útero, e verificou que em mulheres com idade superior a 40 anos há maior prevalência de lesões de alto grau com maior probabilidade de persistência e progressão ao câncer invasor. Segundo Aleksioska-Papestiev et al., 2018 em populações que não possuem programas de rastreamento ao câncer consolidados, é frequente a detecção de alterações cervicais em mulheres com idade igual ou superior a 55 anos.

É bem descrito na Literatura que o desenvolvimento do câncer de colo está intimamente relacionado à infecção por HPV de alto risco (Groves & Coleman, 2015) sendo esta pré-requisito para o desenvolvimento das lesões iniciais até o câncer invasor (Zheng *et al.*, 2019). No presente estudo, 60% das amostras analisadas apresentaram PCR positivo para o DNA-HPV. Contudo, taxas maiores de positividade

para o HPV foram reportadas em outros estudos, que detectaram o HPV em 96,5% de câncer do colo do útero confirmadas por Histopatologia (Stuebs *et al.*, 2021). Adicionalmente, em um outro estudo, foi detectado uma positividade de 97,4% em amostras de diferentes etapas de desenvolvimento do câncer do colo do útero (amostra controle, NIC1, NIC2, NIC3 e câncer do colo do útero) (So *et al.*, 2019). Tal diferença pode ser provavelmente atribuída as diferentes metodologias de diagnóstico utilizadas nestes diferentes estudos.

No presente estudo, verificamos que a taxa de positividade para o DNA-HPV aumenta gradativamente de acordo com a progressão das lesões cervicais, sendo de 46,7% (14/30) nas amostras no grupo NIC1, de 52,9% (18/34) nas amostras do grupo NIC2, de 75% (27/36) nas amostras do grupo NIC3 e de 90,6% (29/32) nas amostras do grupo CCE. Nossos resultados estão de acordo com um estudo sistemático realizado (Bzhalava *et al.*, 2013), onde foi reportado que a prevalência do HPV aumentava com a progressão das lesões de NIC1 a NIC3, iniciando com 74,2% (7.442/10.030) em NIC1, seguido de 85,4% (4.106/4.809) em NIC2, 92,4% (10.791/11.679) em NIC3 e 89,5% (36.785/41.101) em câncer do colo do útero. Contudo, valores distintos foram reportados por (So *et al.*, 2019), onde a prevalência para o HPV em biópsias de NIC1 foi de 91,5% (365/399), de NIC2 foi de 99,5% (398/400), em biópsias de NIC3 foi 99,5% (398/400) e em amostras de câncer, de 99,2% (386/399). Contudo, um estudo conduzido no Brasil reportou uma positividade do DNA-HPV de 100% em todas as amostras analisadas (39 amostras de NIC1, 7 amostras de NIC2, 11 amostras de NIC3 e 3 amostras de câncer) (Miranda *et al.*, 2020). Juntos, esses dados demonstram que a taxa de positividade para o DNA-HPV em tecidos portadores de lesões cervicais e de câncer de colo pode variar de acordo com o tipo de amostra utilizada (amostra congelada em nitrogênio líquido versus incluída em parafina), com a sensibilidade da metodologia de detecção empregada, com o número de pacientes incluídos no estudo e com a região em que estes estudos foram realizados. Neste aspecto, a menor positividade para o DNA-HPV observada nas amostras analisadas neste estudo está provavelmente relacionada às etapas pré-analíticas como a exposição ao formaldeído, ao protocolo de fixação e ao tempo de armazenamento das amostras em parafina, que potencialmente degradam os ácidos nucleicos e expõem o DNA extraído à presença de inibidores de PCR, que permanecem durante a etapa de extração do DNA (Alvarez-Aldana *et al.*, 2015; Seiler

et al., 2016). Apesar desta limitação, nossos resultados demonstram, como discutido anteriormente, um aumento da positividade para o HPV com o aumento da severidade da lesão cervical.

A infecção persistente pelo HPV é essencial para o desenvolvimento de lesões no colo uterino (Chan *et al.*, 2019) e esta progressão se relaciona com expressão das oncoproteínas E6 e E7, que se inicia com níveis mais baixos em lesões de NIC1 e que vai aumentando até lesões de NIC3 (Durzynska *et al.*, 2017; Harden & Munger, 2017). O tipo de HPV também influencia na severidade da lesão, onde os HPV 16, 31, 33, 52 e 58 se correlacionam com lesões de alto grau e os HPV 39, 51, 53, 56, 66, 68 são mais relevantes em lesões de baixo grau (So *et al.*, 2019).

É conhecida a relação dos HPV de alto risco no desenvolvimento das lesões intra-epiteliais e do câncer do colo do útero sendo os de maior prevalência o HPV 16 (44,6%), 18 (17,4%) e 31 (11,6%) (Dalgo Aguilar *et al.*, 2017; Aleksioska-Papestiev *et al.*, 2018; Colpani *et al.*, 2020). No presente estudo, encontramos prevalência similar dos HPVs 16 e 18, seguidos dos outros tipos de HPV que podem variar em prevalência segundo a distribuição geográfica, o estado imune dos pacientes e a incidência dos fatores de risco na população (Chan *et al.*, 2019; Colpani *et al.*, 2020). Destaca-se que a presença do DNA do HPV 16 aumenta segundo a progressão das lesões no tecido cervical; resultados similares foram obtidos por outros grupos de pesquisa (Gori *et al.*, 2021; Stuebs *et al.*, 2021; Pimple & Mishra, 2022).

Em relação aos marcadores analisados nosso estudo é o primeiro a estratificar as camadas e componentes do estroma do tecido cervical para analisar a expressão da subunidade  $\beta$ A ativina/inibina e folistatina em cada uma delas. No presente estudo, a expressão da subunidade  $\beta$ A ativina/inibina, no epitélio normal do colo do útero, foi identificada em todas as camadas do epitélio tanto no núcleo como no citoplasma.

O grupo controle apresentou maior imunosscore para a subunidade  $\beta$ A no citoplasma e no núcleo das distintas camadas epiteliais do grupo Controle. Contudo, durante as diferentes etapas da progressão da lesão neoplásica cervical, esta marcação diminui. Deste modo, a diminuição da expressão da subunidade  $\beta$ A estaria relacionada com a perda do controle da diferenciação e proliferação de células pré-tumorais (NIC-3) e tumorais (CCE), demonstrando um provável comprometimento das vias de sinalização mediadas por ativina A, AB e ou inibina A. Por outro lado, é



possível que uma expressão diminuída da subunidade  $\beta A$  nas células alteradas do câncer do colo do útero, ainda sejam capazes de secretar ativina A no fluido cervical como descrito em estudo anterior (Petraglia et al., 1998). Esses dados sugerem, que alterações na expressão da subunidade  $\beta A$  pode desempenhar um importante papel na patogênese do câncer de colo de útero. Seja de modo autócrino/parácrino (local), quanto de modo endócrino (no fluido cervical). É importante ressaltar que a ação da ativina A no desenvolvimento de tumores depende do tipo celular e do estado da lesão, assim o comprometimento dos mediadores das vias de sinalização estimuladas pela ativina A, incluindo alteração na expressão e funcionalidade de seus receptores, das vias de sinalização intracelular (SMADS) e proteínas neutralizantes (folistatinas), possuem o potencial de alterar o estado fenotípico e proliferativo de diferentes tipos celulares (Bloise et al., 2019a). E também de importância é o papel da ativina A funcionando como supressor tumoral em estágios iniciais da carcinogênese em diversos tipos celulares (Tsuchida et al., 2009). Neste aspecto, em tumores de pele induzidos pelo HPV tipo 8 foi observado que a ativina A favoreceu a progressão tumoral, via ação de macrófagos pro tumorigênicos (Morianos et al., 2019), achado que conecta o vírus do HPV com o sistema ativina-inibina-folistatina.

Neste estudo foi verificada uma menor imunomarcagem citoplasmática e nuclear da subunidade  $\beta A$  nos vasos sanguíneos de NIC1, NIC2, NIC3 e CCE, comparada com o grupo controle. O efeito da ativina A regulando diferentes aspectos da angiogênese é controverso, no sentido que alguns estudos descrevem que a ativina A desempenha um efeito pró- (Oliveira, de et al., 2020) ou anti-angiogênico (Panopoulou et al., 2005; Kaneda et al., 2011) em diferentes tipos de tumores. Adicionalmente, durante a resposta inflamatória, as células endoteliais são uma importante fonte de ativina A, estimuladas pelas citocinas IL-6 ou IL-1 $\beta$  (Phillips et al., 2001). Neste contexto, o papel do sistema ativina-inibina-folistatina na angiogênese em lesões da cérvix humana, assim como o conhecimento de como a desregulação endotelial do Sistema pode estar envolvida com a progressão da lesão NIC1 até o câncer do colo do útero, necessita ser investigada mais profundamente.

Também observamos que a expressão da subunidade ativina/inibina  $\beta A$  foi detectada majoritariamente no núcleo celular do infiltrado inflamatório no grupo controle, e que a mesma diminui nas etapas subsequentes de progressão das lesões cervicais investigadas. Diversas células pró-inflamatórias podem ser estimuladas pela

ativina A, que pode apresentar atividade tanto pró como anti-inflamatória de acordo com a etapa de maturação dos macrófagos (Bloise *et al.*, 2019a; Morianos *et al.*, 2019). Por exemplo, neutrófilos podem ser ativados pela ativina A via indução mediada por TNF (Morianos *et al.*, 2019). A ativina A também pode inibir a proliferação de Linfócitos B e promover a diferenciação de linfócitos T. Para melhor se discutir o significado biológico da diminuição da marcação da subunidade ativina/inibina  $\beta$ A no infiltrado inflamatório durante a progressão da lesão cervical, seria necessário realizar a caracterização dos tipos celulares que compõem o infiltrado inflamatório, o que deverá ser realizado em futuros estudos. Contudo, é importante salientar que a ativina A relaciona-se com o desenvolvimento da resposta imunológica frente a infecções virais. Já foi reportado que o aumento de ativina A tecidual pode se relacionar com a inibição da replicação do vírus da hepatite C, do citomegalovírus humano e do Zika vírus. Contudo, nas etapas crônicas das infecções pelos vírus da hepatite A e B e H1N1, um aumento da expressão local de ativina A se relaciona com a cronicidade das lesões, promovendo fibrose dos tecidos acometidos (Morianos *et al.*, 2019).

O presente estudo demonstrou que o escore de imunomarcção da subunidade ativina  $\beta$ A em etapas crônicas das lesões cervicais é menor, comparada com o grupo controle. Considerando-se que o aumento da ativina A se relaciona à inibição da replicação viral (Morianos *et al.*, 2019), e que em nossa *cohort* a positividade do HPV aumentou de acordo com o agravamento das lesões, é possível especular que uma diminuição do escore de imunoreatividade da subunidade  $\beta$ A poderia estar relacionada a uma maior positividade tecidual ao HPV, e conseqüentemente, ao agravamento da lesão cervical, uma hipótese que claramente requer uma investigação mais detalhada.

Com relação a folistatina, esta participa da tumorigênese, metástase e angiogênese de distintos tipos de tumores, por intermédio de sua interação com membros das super-família TGF- $\beta$ , em especial as ativinas (Shi *et al.*, 2016; Seachrist & Keri, 2019). Além disso, pode apresentar atividade proliferativa ou inibitória da proliferação em distintos tipos de tumores, dependendo dos tipos de células envolvidas e das vias de sinalização ativadas (Loomans *et al.*, 2014; Wijayarathna & Kretser, de, 2016). Entretanto, o entendimento da função da folistatina na progressão do câncer do colo do útero ainda é bastante limitado (Adu-gyamfi *et al.*, 2020).

Na presente tese, identificamos que a expressão da folistatina foi observada em todas as camadas epiteliais e em componentes do estroma da cérvix normal, e também durante a aquisição do fenótipo neoplásico característico do câncer de colo do útero, o que sugere um importante papel biológico da proteína nesta patologia. Contudo, demonstramos que a folistatina apresentou um imunoescore nuclear maior no grupo controle e que essa marcação diminuiu, de forma estrato celular-dependente, com a progressão da lesão cervical até o câncer. Além disso, observamos maiores alterações no imunoescore nuclear da folistatina do que no imunoescore citoplasmático. Embora ainda não se conheça qual seja a função biológica da folistatina no núcleo celular, nossos dados sugerem que a diminuição da imunomarcação da folistatina nuclear está relacionada à progressão da lesão cervical. Ademais, como não observamos alterações da imunomarcação citoplasmática de folistatina, é possível que não ocorra alterações na secreção de folistatina pelas células cervicais ao longo do aumento da severidade da lesão cervical, e portanto, não exista diminuição na magnitude de neutralização de ativina extracelular, pela folistatina. Contudo, é possível que sua função ainda desconhecida, como proteína nuclear/perinuclear, esteja prejudicada.

É importante salientar que a diminuição do imunoescore nuclear da folistatina ocorreu na camada intermediária entre os grupos controle e NIC1, e na camada superficial, onde a diferença ocorreu entre o grupo controle e NIC1/NIC2. Embora não tenhamos observado alterações no imunoescore da folistatina na camada basal, é possível que as alterações identificadas nas camadas intermediária e superficial, tenham tido origem na camada basal, ou terem sido adquiridas ao longo da diferenciação das células basais, induzidas diretamente pela infecção pelo HPV ou terem sido indiretamente resultantes das alterações celulares decorrentes da aquisição de um fenótipo pré-tumoral/tumoral ou pelo microambiente tecidual local alterado.

Nos vasos sanguíneos cervicais, identificamos uma diminuição da imunomarcação da folistatina comparando o grupo controle com amostras de NIC1-câncer. Com relação à presença de folistatina em células inflamatórias, o imunoescore nuclear diminuiu do grupo controle ao grupo câncer. Foi demonstrado que a folistatina pode ser secretada por células endoteliais quando estimuladas por citocinas pró-inflamatórias (Phillips *et al.*, 2001). Portanto, nossos resultados indicam que a

folistatina nuclear poderia estar relacionada com a angiogênese e função vascular nas lesões cervicais (Ogino *et al.*, 2008; Sepporta *et al.*, 2013). Além disso, nossos dados sugerem que a diminuição da folistatina nuclear potencialmente contribui com a progressão das lesões, seja através de sua ação direta no epitélio cervical, ou indireta nos vasos sanguíneos e nas células que compõem os infiltrados inflamatórios.

Comparando os grupos HPV positivos e negativos, o grupo controle da subunidade  $\beta$ A apresentou uma maior imunomarcagem nuclear comparada aos grupos HPV positivos. Tomando em conta que estudos prévios que relacionam a presença de Ativina A com uma resposta imunológica antiviral, por ativação de leucócitos (Morianos *et al.*, 2019), podemos indicar uma possível relação entre a presença de HPV com a progressão das lesões no câncer cervical.

De modo importante, ainda são necessários estudos que visem analisar a expressão das subunidades  $\beta$ B e da  $\alpha$ -inibina, para assim descrever o padrão de imunolocalização das ativinas B, AB e inibinas, durante a aquisição do fenótipo neoplásico cervical na presença da infecção pelo HPV. Deste modo, os componentes do sistema ativina-inibina-folistatina poderiam ser explorados como servir como potenciais marcadores de diagnóstico e do prognóstico do câncer do colo do útero.

## 7. Conclusões

O presente estudo demonstrou que a positividade do HPV16 aumenta com a idade da paciente e com o agravamento da lesão intra-epitelial cervical.

A subunidade  $\beta$ A ativina/inibina é expressa no citoplasma e no núcleo das células do epitélio e do estroma cervical, em uma população majoritariamente positiva para o HPV.

A expressão da subunidade  $\beta$ A ativina/inibina em células do epitélio cervical se relaciona com a progressão do câncer do colo do útero, onde se observa uma diminuição do seu imunosscore a partir de NIC1 até o câncer.

Demonstrou-se que a folistatina é expressa no citoplasma e no núcleo das células do epitélio estratificado e do estroma cervicais.

A expressão de folistatina se relaciona com o controle do desenvolvimento do câncer do colo do útero, sendo verificada maior expressão da proteína em amostras controle e a diminuição desta expressão em amostras de câncer do colo do útero.

A expressão da subunidade  $\beta$ A ativina/inibina nas camada basal ou massa tumoral se relaciona com a presença de HPV.

## 8. Referências

ABBAS AK; LICHTMAN AHH; PILLAI S. **Cellular and Molecular Immunology E-Book**. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 2017.

ADU-GYAMFI EA; TANAM F; NELSON W; CZIKA A; KUMAR S; LAMPTEY J; DING Y; WANG Y. Cytokine Activin and inhibin signaling: From regulation of physiology to involvement in the pathology of the female reproductive system. **Cytokine**, 133, February, 155105, 2020.

AKSOY P; GOTTSCHALK EY; MENESES PI. HPV entry into cells. **Mutat. Res. Mutat. Res.**, 772, 13–22, 1 abr. 2017.

ALEKSIOSKA-PAPESTIEV I; CHIBISHEVA V; MICEVSKA M; DIMITROV G. 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.**, 90, 2, 137–148, 2012.

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

ANACKER DC; MOODY CA. Modulation of the DNA damage response during the life cycle of human papillomaviruses. **Virus Res.**, 231, 41–49, 2 mar. 2017.

ANTSIFEROVA M; PIWKO-CZUCHRA A; CANGKRAMA M; WIETECH A; SAHIN D; BIRKNER K; AMANN VC; LEVESQUE M; HOHL D; DUMMER R; WERNER S. Activin promotes skin carcinogenesis by attraction and reprogramming of macrophages. **EMBO Mol. Med.**, 9, 1, 27–45, 2017.

BALANATHAN P; WILLIAMS ED; WANG H; PEDERSEN JS; HORVATH LG; ACHEN MG; STACKER SA; RISBRIDGER GP. Elevated level of inhibin- $\alpha$  subunit is pro-tumourigenic and pro-metastatic and associated with extracapsular spread in advanced prostate cancer. **Br. J. Cancer**, 100, 11, 1784–1793, 2009.

BERGVALL M; MELENDY T; ARCHAMBAULT J. The E1 proteins. **Virology**, 445, 1–2, 35–56, 2013.

BLOISE E; CIARMELA P; CRUZ C DELA; LUISI S; PETRAGLIA F; REIS FM. Activin A in mammalian physiology. **Physiol. Rev.**, 99, 1, 739–780, 2019a.

\_\_\_\_. Activin A in Mammalian Physiology. **Physiol. Rev.**, 99, 1, 739–780, jan. 2019b.

BLOISE E; COUTO HL; MASSAI L; CIARMELA P; MENCARELLI M; BORGES LE; MUSCETTOLA M; GRASSO G; AMARAL VF; CASSALI GD; PETRAGLIA F; REIS FM. Differential expression of follistatin and FLRG in human breast proliferative disorders. **BMC Cancer**, 9, 320, 2009.

BODELON C; UNTEREINER ME; MACHIELA MJ; VINOKUROVA S; WENTZENSEN N. Genomic characterization of viral integration sites in HPV-related cancers. **Int. J. Cancer**, 139, 9, 2001–2011, 2016.

BORRUTO F; RIDDER M DE. **HPV and Cervical Cancer Achievements in Prevention and Future Prospects**. London: Springer, 2012.

BOUCHILLOUX S *et al.* Correlation between integration of high-risk HPV genome into human DNA detected by molecular combing and the severity of cervical lesions: First results of the EXPL-HPV-002 study. **Ces. Gynekol.**, 84, 2, 84–92, 2019.

BUCK CB; DAY PM; TRUS BL. The papillomavirus major capsid protein L1. **Virology**, 445, 1–2, 169–174, 2013.

BUJARSKI J; GALLITELLI D; FERNANDO, GARCÍA-ARENAL VICENTE P; PALUKAITIS P; REDDY MK; WANG A. Virus Taxonomy The ICTV Report on Virus Classification and Taxon Nomenclature Asfarviridae Chapter Asfarviridae Virion Morphology Physicochemical and physical properties. **J. Gen. Virol.**, 100, 1206–1207, 2019.

BURD E. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin Microbiol Rev**, 16, 1, 1–17, 2003.

BURD EM; DEAN CL. Human Papillomavirus. *In*: **Diagnostic Microbiol. Immunocompromised Host, Second Ed.** [s.l.] American Society of Microbiology, 2016. v. 4177–195.

BURGES A; SHABANI N; BRÜNING A; MYLONAS I. Inhibin-betaA and -betaB subunits in normal and malignant glandular epithelium of uterine cervix and HeLa

cervical cancer cell line. **Arch. Gynecol. Obstet.**, 284, 4, 981–988, 17 out. 2011.

BZHALAVA D; EKLUND C; DILLNER J. International standardization and classification of human papillomavirus types. **Virology**, 476, 341–344, 2015.

BZHALAVA D; GUAN P; FRANCESCHI S; DILLNER J; CLIFFORD G. A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. **Virology**, 445, 1–2, 224–231, 2013.

CAMARGOS D DE S. **Análise das populações de células de langerhans e linfocitária em lesões escamosas intra-epiteliais cervicais e invasoras do colo uterino.** [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

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

CHELIMO C; WOULDES TA; CAMERON LD; ELWOOD JM. Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. **J. Infect.**, 66, 3, 207–217, 2013.

CHEN F; REN P; FENG Y; LIU H; SUN Y; LIU Z; GE J; CUI X. Follistatin is a novel biomarker for lung adenocarcinoma in humans. **PLoS One**, 9, 10, 1–8, 2014.

CIARMELA P; BLOISE E; GRAY PC; CARRARELLI P; ISLAM MS; PASCALIS F DE; SEVERI FM; VALE W; CASTELLUCCI M; PETRAGLIA F. Activin-A and Myostatin Response and Steroid Regulation in Human Myometrium: Disruption of Their Signalling in Uterine Fibroid. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 96, 3, 755–765, 1 mar. 2011.

COLPANI V; FALCETTA FS; BIDINOTTO AB; KOPS NL; FALAVIGNA M; HAMMES LS; BENZAKEN AS; MARANHÃO AGK; DOMINGUES CMAS; WENDLAND EM. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, 15, 2, 2020.

COUTO HL; BUZELIN MA; TOPPA NH; BLOISE E; WAINSTEIN AJ; REIS FM. Prognostic value of follistatin-like 3 in human invasive breast cancer. **Oncotarget**, 8, 26, 42189–42197, 2017.

CROSBIE EJ; EINSTEIN MH; FRANCESCHI S; KITCHENER HC. Human



papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**, 382, 9895, 889–899, 2013.

DALGO AGUILAR P; LOJÁN GONZÁLEZ C; CÓRDOVA RODRÍGUEZ A; ACURIO PAÉZ K; ARÉVALO AP; BOBOKOVA J. Prevalence of High-Risk Genotypes of Human Papillomavirus: Women Diagnosed with Premalignant and Malignant Pap Smear Tests in Southern Ecuador. **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.**, 2017, 12–14, 2017.

DIMAIO D; PETTI LM. The E5 proteins. **Virology**, 445, 1–2, 99–114, 2013.

DOORBAR J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clin. Sci.**, 110, 5, 525–541, 2006.

\_\_\_\_. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. **Virology**, 445, 1–2, 80–98, 2013.

DOORBAR J; QUINT W; BANKS L; BRAVO IG; STOLER M; BROKER TR; STANLEY MA. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, 30, SUPPL.5, F55–F70, 2012.

DURZYNSKA J; LESNIEWICZ K; POREBA E. Human papillomaviruses in epigenetic regulations. **Mutat. Res. Mutat. Res.**, 772, 36–50, 1 abr. 2017.

EBERT S; NAU R; MICHEL U. Role of activin in bacterial infections: A potential target for immunointervention? **Immunotherapy**, 2, 5, 673–684, 2010.

EGAWA N; EGAWA K; GRIFFIN H; DOORBAR J. Human papillomaviruses; Epithelial tropisms, and the development of neoplasia. **Viruses**, 7, 7, 3863–3890, 2015.

EGAWA N; NAKAHARA T; OHNO S -I.; NARISAWA-SAITO M; YUGAWA T; FUJITA M; YAMATO K; NATORI Y; KIYONO T. The E1 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Is Dispensable for Maintenance Replication of the Viral Genome. **J. Virol.**, 86, 6, 3276–3283, 2012.

FEDCHENKO N; REIFENRATH J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue - a review. **Diagn. Pathol.**, 9, 221, 2014.

FERNANDES JV; ARAÚJO JMG DE; FERNANDES TAA DE M. Biology and natural history of human papillomavirus infection. **Open Access J. Clin. Trials**, 5, 1,

1–12, 2013.

GADELHA SR; SOARES-BARRETO DMV; COSTA GB; LEAL VCN; GOMES LGS; SANTOS UR; FERREIRA GCS; CARVALHO LD; SORAES-ALMEIDA SMV; MELLO MAG; MARIANO APM; SOUSA SMB; VAGO AR; MARIN LJ. Clinical, laboratory and epidemiological aspects of HPV infection in a low-income population from South Bahia, Brazil. **Epidemiol. Infect.**, 145, 16, 3398–3404, 2017.

GAO X; WEI S; LAI K; SHENG J; SU J; ZHU J; DONG H; HU H; XU Z. Nucleolar follistatin promotes cancer cell survival under glucose-deprived conditions through inhibiting cellular rRNA synthesis. **J. Biol. Chem.**, 285, 47, 36857–36864, 2010.

GASPAR J. **Perfil sociodemográfico e clínico de mulheres com infecção genital pelo Papilomavirus humano atendidas em um hospital de referência do interior paulista.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

GOLD E *et al.* Activin C Antagonizes Activin A in Vitro and Overexpression Leads to Pathologies in Vivo. **Am. J. Pathol.**, 174, 1, 184–195, 1 jan. 2009.

GORI S; BATTAGELLO J; GUSTINUCCI D; CAMPARI C; ZORZI M; FRAYLE H; PASSAMONTI B; SARTORI G; BULLETTI S; FODERO C; CESARINI E; FAGGIANO R; MISTRO A DEL. Clinical relevance of partial HPV16/18 genotyping in stratifying HPV-positive women attending routine cervical cancer screening: a population-based cohort study. **BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.**, 128, 8, 1353–1362, 2021.

GRAHAM S; GRAHAM; V. S. Keratinocyte Differentiation-Dependent Human Papillomavirus Gene Regulation. **Viruses**, 9, 9, 245, 30 ago. 2017.

GRAHAM S V. Human Papillomavirus E2 Protein: Linking Replication, Transcription, and RNA Processing. **J. Virol.**, 90, 19, 8384–8388, 2016.

GRAHAM SV. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. **Clin. Sci.**, 131, 17, 2201–2221, 2017.

GRCE M; HUSNJAK K; MAGDIĆ L; ILIJAŠ M; ZLAČKI M; LEPUŠIĆ D; LUKAČ J; HODEK B; GRIZELJ V; KURJAK A; KUSIĆ Z; PAVELIĆ K. Detection and typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction in cervical scrapes of Croatian women with abnormal cytology. **Eur. J. Epidemiol.**, 13, 6, 645–651, 1997.

GREER CE; PETERSON SL; KIVIAT NB; MANOS MM. PCR Amplification from Paraffin-Embedded Tissues: *Effects of Fixative and Fixation Time*. **Am. J. Clin. Pathol.**, 95, 2, 117–124, 1 fev. 1991.

GRIFFIN H; SONEJI Y; BAARS R VAN; ARORA R; JENKINS D; SANDT M VAN DE; WU Z; QUINT W; JACH R; OKON K; HURAS H; SINGER A; DOORBAR J. Stratification of HPV-induced cervical pathology using the virally encoded molecular marker E4 in combination with p16 or MCM. **Mod. Pathol.**, 28, 7, 977–993, 2015.

GROVES IJ; COLEMAN N. Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. **J. Pathol.**, 235, 4, 527–538, 2015.

\_\_\_\_. Human papillomavirus genome integration in squamous carcinogenesis: what have next-generation sequencing studies taught us? **J. Pathol.**, 245, 1, 9–18, 2018.

HARDEN ME; MUNGER K. Human papillomavirus molecular biology. **Mutat. Res. Mutat. Res.**, 772, 3–12, 1 abr. 2017.

HASHIMOTO O; KAWASAKI N; TSUCHIDA K; SHIMASAKI S; HAYAKAWA T; SUGINO H. Difference between follistatin isoforms in the inhibition of activin signalling: Activin neutralizing activity of follistatin isoforms is dependent on their affinity for activin. **Cell. Signal.**, 12, 8, 565–571, 2000.

HELDIN CH; MOUSTAKAS A. Role of Smads in TGF $\beta$  signaling. **Cell Tissue Res.**, 347, 1, 21–36, 2012.

HERFS M; YAMAMOTO Y; LAURY A; WANG X; NUCCI MR; MCLAUGHLIN-DRUBIN ME; MÜNGER K; FELDMAN S; MCKEON FD; XIAN W; CRUM CP. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 109, 26, 10516–10521, 2012.

HERRINGTON CS. **Pathology of the Cervix**. [s.l.] Springer International Publishing, 2017.

HONG S; LAIMINS LA. Manipulation of the innate immune response by human papillomaviruses. **Virus Res.**, 231, 34–40, 2017.

HOPPE-SEYLER K; BOSSLER F; BRAUN JA; HERRMANN AL; HOPPE-SEYLER F. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and

Therapeutic Targets. **Trends Microbiol.**, 26, 2, 158–168, 1 fev. 2018.

HÜBNER G; ALZHEIMER C; WERNER S. Activin: A novel player in tissue repair processes. **Histol. Histopathol.**, 14, 1, 295–304, 1999.

IBEANU OA. Molecular pathogenesis of cervical cancer. **Cancer Biol. Ther.**, 11, 3, 295–306, 2011.

IKENBERG H. Laboratory diagnosis of human papillomavirus infection. **Curr. Probl. Dermatol.**, 45, 166–74, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA - INCA. **Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil.** [s.l: s.n.].

\_\_\_\_. **Câncer do colo do útero.** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero/profissional-de-saude>>. Acesso em: 10 mar. 2020.

\_\_\_\_. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: MINISTÉRIO DA SAÚDE INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA), 2019.

JAKOWLEW SB. Transforming growth factor- $\beta$  in cancer and metastasis. **Cancer Metastasis Rev.**, 25, 3, 435–457, 2006.

JELKMANN W. Activin receptor ligand traps in chronic kidney disease. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, 27, 5, 351–357, 2018.

JIMÉNEZ-WENCES H; PERALTA-ZARAGOZA O; FERNÁNDEZ-TILAPA G. Human papilloma virus, DNA methylation and microRNA expression in cervical cancer (Review). **Oncol. Rep.**, 31, 6, 2467–2476, 2014.

JOHANNSEN E; LAMBERT PF. Epigenetics of human papillomaviruses. **Virology**, 445, 1–2, 205–212, 2013.

JOHANSSON C; SCHWARTZ S. Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. **Nat. Publ. Gr.**, 11, 4, 239–251, 2013.

JONES CP; GREGORY LG; CAUSTON B; CAMPBELL GA; LLOYD CM. Activin A and TGF- $\beta$  promote TH9 cell-mediated pulmonary allergic pathology. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 129, 4, 1000-1010.e3, 2012.

JONES KL; MANSELL A; PATELLA S; SCOTT BJ; HEDGER MP; KRETSER

DM DE; PHILLIPS DJ. Activin A is a critical component of the inflammatory response, and its binding protein, follistatin, reduces mortality in endotoxemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 104, 41, 16239–16244, 2007.

JÜCKSTOCK J; BRÜNING A; BLANKENSTEIN T; KUNZE S; SHABANI N; BERGAUER F; MYLONAS I. Immunolabeling of the inhibin- $\beta$ a and - $\beta$ B Subunit in Normal and Malignant Human Cervical Tissue and Cervical Cancer Cell Lines. **Int. J. Gynecol. Cancer**, 20, 7, 15, 1 out. 2010.

KALKHOVEN E; ROELEN BAJ; WINTER JP DE; MUMMERY CL; EIJNDEN-VAN RAAIJ AJM VAN DEN; SAAG PT VAN DER; BURG B VAN DER. Resistance to transforming growth factor  $\beta$  and activin due to reduced receptor expression in human breast tumor cell lines. **Cell Growth Differ.**, 6, 9, 1151–1161, 1995.

KANEDA H *et al.* Activin A inhibits vascular endothelial cell growth and suppresses tumour angiogenesis in gastric cancer. **Br. J. Cancer**, 105, 8, 1210–1217, 2011.

KANEKO H. Activin. *In: Handb. Horm.* [s.l.] Elsevier Inc., 2016a. 295–297, e33B-2-e33B-2.

\_\_\_\_\_. Follistatin. *In: Handb. Horm.* [s.l.] Elsevier Inc., 2016b. 298–300, e33C-1-e33C-2.

KEUTMANN HT; SCHNEYER AL; SIDIS Y. The Role of Follistatin Domains in Follistatin Biological Action. **Mol. Endocrinol.**, 18, 1, 228–240, 2004.

KIM JM; LEE JK; CHOI SM; LEE J; PARK YS; LEE CH; YIM JJ; YOO CG; KIM YW; HAN SK; LEE SM. Diagnostic and prognostic values of serum activin-a levels in patients with acute respiratory distress syndrome. **BMC Pulm. Med.**, 19, 1, 1–8, 2019.

KLAUZINSKA M; CASTRO NP; RANGEL MC; SPIKE BT; GRAY PC; BERTOLETTE D; CUTTITTA F; SALOMON D. The multifaceted role of the embryonic gene Cripto-1 in cancer, stem cells and epithelial-mesenchymal transition. **Semin. Cancer Biol.**, 29, 0, 51–58, 2014.

KURMAN RJ; CARCANGIU ML; HERRINGTON CS; YOUNG RH. **WHO classification of tumours of female reproductive organs**. 4th editio ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2014.

KURMAN RJ; ELLENSON LH; RONNETT BM. **Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract.** [s.l.] Springer International Publishing, 2019.

KWAK K; JIANG R; WANG JW; JAGU S; KIRNBAUER R; RODEN RBS. Impact of inhibitors and L2 antibodies upon the infectivity of diverse alpha and beta human papillomavirus types. **PLoS One**, 9, 5, 2014.

LA GARZA-SALAZAR JG DE; MORALES-VÁSQUEZ F; MENESES-GARCIA A. **Cervical cancer.** [s.l.] Springer International Publishing, 2017.

LEE JK; CHOI SM; LEE J; PARK YS; LEE CH; YIM JJ; YOO CG; KIM YW; HAN SK; LEE SM. Serum activin-A as a predictive and prognostic marker in critically ill patients with sepsis. **Respirology**, 21, 5, 891–897, 2016.

LI W *et al.* Characteristic of HPV Integration in the Genome and Transcriptome of Cervical Cancer Tissues. **Biomed Res. Int.**, 2018, 2018.

LIMA RDCP DE. **IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE VARIANTES DO ONCOGENE E7 DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO 16.** [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

LINK AS; ZHENG F; ALZHEIMER C. Activin Signaling in the Pathogenesis and Therapy of Neuropsychiatric Diseases. **Front. Mol. Neurosci.**, 9, 32, 10 maio 2016.

LINKO R; HEDGER MP; PETTILÄ V; RUOKONEN E; ALA-KOKKO T; LUDLOW H; KRETZER DM DE. Serum activin A and B, and follistatin in critically ill patients with influenza A(H1N1) infection. **BMC Infect. Dis.**, 14, 1, 1–9, 2014.

LIU CY; LI F; ZENG Y; TANG M ZHONG; HUANG Y; LI JT; ZHONG RG. Infection and integration of high-risk human papillomavirus in HPV-associated cancer cells. **Med. Oncol.**, 32, 4, 2015.

LOOMANS HA; ANDL CD; ANDL CD; ANDL CD; ANDL CD; ANDL CD. Intertwining of activin a and TGF $\beta$  signaling: Dual roles in cancer progression and cancer cell invasion. **Cancers (Basel)**., 7, 1, 70–91, 2014.

MACIAS MJ; MARTIN-MALPARTIDA P; MASSAGUÉ J. Structural determinants of SMAD function in TGF- $\beta$  signaling. **Trends Biochem. Sci.**, 40, 6, 296–308, 2015.

MAESHIMA A; MIYA M; MISHIMA K; YAMASHITA S; KOJIMA I; NOJIMA Y. Activin A: Autocrine Regulator of Kidney Development and Repair. **Endocr. J.**, 55, 1, 1–9, 2008.

MAKANJI Y; ZHU J; MISHRA R; HOLMQUIST C; WONG WPS; SCHWARTZ NB; MAYO KE; WOODRUFF TK. Inhibin at 90: From discovery to clinical application, a historical review. **Endocr. Rev.**, 35, 5, 747–794, 2014.

MARINO FE; RISBRIDGER G; GOLD E. Re-evaluating the role of activin- $\beta$ C in cancer biology. **Cytokine Growth Factor Rev.**, 26, 4, 463–470, 2015.

MARINO G; ZANGHÌ A. Activins and inhibins: Expression and role in normal and pathological canine reproductive organs: A review. **J. Vet. Med. Ser. C Anat. Histol. Embryol.**, 42, 1, 1–8, 2013.

MARTINS TR; MENDES DE OLIVEIRA C; ROSA LR; CAMPOS CENTRONE C DE; RODRIGUES CLR; VILLA LL; LEVI JE. HPV genotype distribution in Brazilian women with and without cervical lesions: Correlation to cytological data. **Viol. J.**, 13, 1, 1–9, 2016.

MATTOSCO D; MEDDA A; CHIOCCA S. Human Papilloma Virus and Autophagy. **Int. J. Mol. Sci.**, 19, 6, 1775, 2018.

MCBRIDE AA. The Papillomavirus E2 proteins. **Virology**, 445, 1–2, 57–79, 2013.

MCBRIDE AA; WARBURTON A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. **PLoS Pathog.**, 13, 4, 1–7, 2017.

MEHTA N; KREPINSKY JC. The emerging role of activins in renal disease. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, 29, 1, 136–144, 2020.

MIRANDA PJC; CHAGAS BS; COÊLHO MRCD; SILVA NETO J DA C. Correlation between human papillomavirus infection and histopathological diagnosis of women in Northeast Brazil. **J. Med. Virol.**, 92, 12, 3799–3806, 2020.

MISTRY N; WIBOM C; EVANDER M. Cutaneous and mucosal human papillomaviruses differ in net surface charge, potential impact on tropism. **Viol. J.**, 5, 1–6, 2008.

MITTAL S; BANKS L. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. **Mutat. Res. Mutat. Res.**, 772, 23–35, 1 abr. 2017.

MOLIJN A; KLETER B; QUINT W; DOORN LJ VAN. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **J. Clin. Virol.**, 32, SUPPL., 43–51, 2005.

MOODY C; MOODY; CARY. Mechanisms by which HPV Induces a Replication Competent Environment in Differentiating Keratinocytes. **Viruses**, 9, 9, 261, 19 set. 2017.

MORIANOS I; PAPADOPOULOU G; SEMITEKOLOU M; XANTHOU G. Activin-A in the regulation of immunity in health and disease. **J. Autoimmun.**, 104, July, 102314, 2019.

MUNZ B; TRETTER YP; HERTEL M; ENGELHARDT F; ALZHEIMER C; WERNER S. The roles of activins in repair processes of the skin and the brain. **Mol. Cell. Endocrinol.**, 180, 1–2, 169–177, 2001.

MUTTUKRISHNA S; TANNETTA D; GROOME N; SARGENT I. Activin and follistatin in female reproduction. **Mol. Cell. Endocrinol.**, 225, 1–2, 45–56, 2004.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH - NIH. **Significado de los cambios en el cuello uterino: Guía para la salud de la mujer.** [s.l: s.n.].

NAYAR R; WILBUR DC. **The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes.** [s.l.] Springer International Publishing, 2015.

NGUYEN HP; RAMÍREZ-FORT MK; RADY PL. The Biology of Human Papillomaviruses. **Mol. Biol. Pathog.**, 45, 19–32, 2014.

OGINO H; YANO S; KAKIUCHI S; MUGURUMA H; IKUTA K; HANIBUCHI M; UEHARA H; TSUCHIDA K; SUGINO H; SONE S. Follistatin suppresses the production of experimental multiple-organ metastasis by small cell lung cancer cells in natural killer cell-depleted SCID mice. **Clin. Cancer Res.**, 14, 3, 660–667, 2008.

OLIVEIRA CE DE; ROCHA DOURADO M; SAWAZAKI-CALONE Í; MEDEIROS MC DE; ROSSA JÚNIOR C; KARLA CERVIGNE N DE; ESQUICHE LEÓN J; LAMBERT D; SALO T; GRANER E; COLETTA RD. Activin A triggers angiogenesis via



regulation of VEGFA and its overexpression is associated with poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. **Int. J. Oncol.**, 57, 1, 364–376, 2020.

OLIVEIRA THA DE. **Avaliação e correlação do perfil de expressão do oncogene E5 do papilomavírus humano e do miRNA- 203 do hospedeiro na carcinogênese cervical.** [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer.** Disponível em: <[http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer)>. Acesso em: 1 jun. 2018.

OYERVIDES-MUÑOZ MA; PÉREZ-MAYA AA; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ HF; GÓMEZ-MACIAS GS; FAJARDO-RAMÍREZ OR; TREVIÑO V; BARRERA-SALDAÑA HA; GARZA-RODRÍGUEZ ML. Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. **Infect. Genet. Evol.**, 61, February, 134–144, 2018.

PANOPOULOU E; MURPHY C; RASMUSSEN H; BAGLI E; ROFSTAD EK; FOTSIS T. Activin A suppresses neuroblastoma xenograft tumor growth via antimitotic and antiangiogenic mechanisms. **Cancer Res.**, 65, 5, 1877–1886, 2005.

PETRAGLIA F; FLORIO P; LUISI S; GALLO R; GADDUCCI A; VIGANÒ P; BLASIO AM DI; GENAZZANI AR; VALE W. 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.**, 83, 4, 1194–1200, 1998.

PHILLIPS DJ; JONES KL; SCHEERLINCK JPY; HEDGER MP; KRETSER DM DE. Evidence for activin A and follistatin involvement in the systemic inflammatory response. **Mol. Cell. Endocrinol.**, 180, 1–2, 155–162, 2001.

PHILLIPS DJ; KRETSER DM DE; HEDGER MP. Activin and related proteins in inflammation: Not just interested bystanders. **Cytokine Growth Factor Rev.**, 20, 2, 153–164, 2009.

PIMPLE S; MISHRA G. Cancer cervix: Epidemiology and disease burden. **Cytojournal**, 19, 21, 2022.

POL SB VANDE; KLINGELHUTZ AJ. Papillomavirus E6 oncoproteins.

**Virology**, 445, 1–2, 115–137, 2013.

PORTER SS; STEPP WH; STAMOS JD; MCBRIDE AA. Host cell restriction factors that limit transcription and replication of human papillomavirus. **Virus Res.**, 231, 10–20, 2017.

PRATI B; MARANGONI B; BOCCARDO E; PRATI BRUNA; MARANGONI BRUNA; BOCCARDO ENRIQUE. Human papillomavirus and genome instability: from productive infection to cancer. **Clinics**, 73, Suppl 1, 9 out. 2018.

QI Y; GE J; MA C; WU N; CUI X; LIU Z. Activin A regulates activation of mouse neutrophils by Smad3 signalling. **Open Biol.**, 7, 5, 2017.

QU W; JIANG G; CRUZ Y; CHANG CJ; HO GYF; KLEIN RS; BURK RD. PCR detection of human papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. **J. Clin. Microbiol.**, 35, 6, 1304–1310, 1997.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing** Vienna, Austria R Foundation for Statistical Computing, , 2017. Disponível em: <<http://www.r-project.org/>>

RAU KM; CHEN YJ; SUN MT; KANG HY. Prognostic effects and regulation of activin A, maspin, and the androgen receptor in upper urinary tract urothelial carcinoma. **Anticancer Res.**, 31, 5, 1713–1720, 2011.

RAUTELA J *et al.* Therapeutic blockade of activin-A improves NK cell function and antitumor immunity. **Sci. Signal.**, 12, 596, 2019.

READER KL; GOLD E. Activins and activin antagonists in the human ovary and ovarian cancer. **Mol. Cell. Endocrinol.**, 415, 126–132, 2015.

REDMOND CJ; FU H; ALADJEM MI; MCBRIDE AA. Human Papillomavirus Integration: Analysis by Molecular Combing and Fiber-FISH. **Curr. Protoc. Microbiol.**, 51, 1, 1–16, 2018.

REFAAT B; EL-SHEMI AG; MOHAMED AM; KENSARA OA; AHMAD J; IDRIS S. Activins and their related proteins in colon carcinogenesis: insights from early and advanced azoxymethane rat models of colon cancer. **BMC Cancer**, 16, 1, 879, 11 dez. 2016.

RICHART RM. Natural History Of Cervical Intraepithelial Neoplasia. **Clin. Obstet. Gynecol.**, 10, 4, 1967.

ROBSON NC; WEI H; MCALPINE T; KIRKPATRICK N; CEBON J; MARASKOVSKY E. Activin-A attenuates several human natural killer cell functions. **Blood**, 113, 14, 3218–3225, 2009.

RODGARKIA-DARA C; VEJDA S; ERLACH N; LOSERT A; BURSCH W; BERGER W; SCHULTE-HERMANN R; GRUSCH M. The activin axis in liver biology and disease. **Mutat. Res. Mutat. Res.**, 613, 2–3, 123–137, 1 nov. 2006.

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

SAIKI RK; SCHARF S; FALOONA F; MULLIS KB; HORN GT; ERLICH HA; ARNHEIM N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, 230, 4732, 1350–4, 20 dez. 1985.

SANJOSÉ S DE; BROTONS M; PAVÓN MA. The natural history of human papillomavirus infection. **Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.**, 47, 2–13, 1 fev. 2018.

SCHIFFMAN M; CASTLE PE; JERONIMO J; RODRIGUEZ AC; WACHOLDER S. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**, 370, 9590, 890–907, 2007.

SCHIFFMAN M; DOORBAR J; WENTZENSEN N; SANJOSÉ S DE; FAKHRY C; MONK BJ; STANLEY MA; FRANCESCHI S. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nat. Rev. Dis. Prim.**, 2, 2016.

SEACHRIST DD; KERI RA. The Activin Social Network: Activin, Inhibin, and Follistatin in Breast Development and Cancer. **Endocrinology**, 160, 5, 1097–1110, 2019.

SELLORS, JOHN W. SANKARANARAYANAN R. **Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia**. Lyon - France: International Agency for Research on Cancer, 2003.

SEPPORTA MV; TUMMINELLO FM; FLANDINA C; CRESCIMANNO M; GIAMMANCO M; GUARDIA M LA; MAJO D DI; LETO G. Follistatin as potential

therapeutic target in prostate cancer. **Target. Oncol.**, 8, 4, 215–223, 2013.

SHANNON B *et al.* Association of HPV infection and clearance with cervicovaginal immunology and the vaginal microbiota. **Mucosal Immunol.**, 10, 5, 1310–1319, 2017.

SHELLING AN. Mutations in inhibin and activin genes associated with human disease. **Mol. Cell. Endocrinol.**, 359, 1–2, 113–120, 2012.

SHI L; RESAUL J; OWEN S; YE L; JIANG WG. Clinical and Therapeutic Implications of Follistatin in Solid Tumours. **Cancer Genomics Proteomics**, 13, 6, 425–436, 2016.

SHIMIZU H; BURNS J. Extraction of Nucleic Acids: Sample Preparation from Paraffin-Embedded Tissues. *In*: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. (Eds.). . **PCR Strateg.** SanDiego, CA: ACADEMIC PRESS, INC., 1995. 32–38.

SIDERAS P; APOSTOLOU E; STAVROPOULOS A; SOUNTOULIDIS A; GAVRIIL A; APOSTOLIDOU A; ANDREAKOS E. Activin, neutrophils, and inflammation: Just coincidence? **Semin. Immunopathol.**, 35, 4, 481–499, 2013.

SO KA; LEE IH; LEE KH; HONG SR; KIM YJ; SEO HH; KIM TJ. Human papillomavirus genotype-specific risk in cervical carcinogenesis. **J. Gynecol. Oncol.**, 30, 4, 1–9, 2019.

SOLOMON D. The 2001 Bethesda System:Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. **Jama**, 287, 16, 2114, 2002.

SOTLAR K; DIEMER D; DETHLEFFS A; HACK Y; STUBNER A; VOLLMER N; MENTON S; MENTON M; DIETZ K; WALLWIENER D; KANDOLF R; BÜLTMANN B. Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, 42, 7, 3176–84, 1 jul. 2004.

SPEEL EJM. **HPV Integration in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: Cause and Consequence.** [s.l: s.n.]. v. 206

SPRIGGS C; LAIMINS L; SPRIGGS CC; LAIMINS LA. Human Papillomavirus and the DNA Damage Response: Exploiting Host Repair Pathways for Viral Replication. **Viruses**, 9, 8, 232, 18 ago. 2017.

STUEBS FA; GASS P; DIETL AK; SCHULMEYER CE; ADLER W; GEPPERT C; HARTMANN A; KNÖLL A; BECKMANN MW; KOCH MC. Human papilloma virus genotype distribution in women with premalignant or malignant lesions of the uterine cervix. **Arch. Gynecol. Obstet.**, 304, 3, 751–758, 2021.

SU X; HUANG L; XIAO D; QU Y; MU D. Research progress on the role and mechanism of action of activin A in brain injury. **Front. Neurosci.**, 12, OCT, 1–7, 2018.

SUGATANI T. Systemic activation of activin a signaling causes chronic kidney disease-mineral bone disorder. **Int. J. Mol. Sci.**, 19, 9, 2018.

SYED V. TGF- $\beta$  Signaling in Cancer. **J. Cell. Biochem.**, 117, 6, 1279–1287, 2016.

THOMPSON TB; LERCH TF; COOK RW; WOODRUFF TK; JARDETZKY TS. The structure of the follistatin: Activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding. **Dev. Cell**, 9, 4, 535–543, 2005.

TOGASHI Y; KOGITA A; SAKAMOTO H; HAYASHI H; TERASHIMA M; VELASCO MA DE; SAKAI K; FUJITA Y; TOMIDA S; KITANO M; OKUNO K; KUDO M; NISHIO K. Activin signal promotes cancer progression and is involved in cachexia in a subset of pancreatic cancer. **Cancer Lett.**, 356, 2, 819–827, 2015.

TOMMASINO M; HASAN U; ACCARDI R. Early Genes of Human Papillomaviruses. *In*: SCHWAB, M. (Ed.). . **Encycl. Cancer**. Berlin: Springer, 2011. 1190–1196.

TORRE LA; ISLAMI F; SIEGEL RL; WARD EM; JEMAL A. Global cancer in women: Burden and trends. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, 26, 4, 444–457, 2017.

TORRES PB; FLORIO P; FERREIRA MC; TORRICELLI M; REIS FM; PETRAGLIA F. Deranged expression of follistatin and follistatin-like protein in women with ovarian endometriosis. **Fertil. Steril.**, 88, 1, 200–205, 1 jul. 2007.

TSUCHIDA K; NAKATANI M; HITACHI K; UEZUMI A; SUNADA Y; AGETA H; INOKUCHI K. Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. **Cell Commun. Signal.**, 7, 1–11, 2009.

TUMMERS B; BURG SH VAN DER. High-risk human papillomavirus targets

crossroads in immune signaling. **Viruses**, 7, 5, 2485–2506, 2015.

VENUTI A; PAOLINI F; NASIR L; CORTEGGIO A; ROPERTO S; CAMPO MS; BORZACCHIELLO G. Papillomavirus E5: The smallest oncoprotein with many functions. **Mol. Cancer**, 10, 1–18, 2011.

WADA M; SHINTANI Y; KOSAKA M; SANO T; HIZAWA K; SAITO S. Immunohistochemical Localization of Activin A and Follistatin in Human Tissues. **Endocr. J.**, 43, 4, 375–385, 1996.

WALENTOWICZ P; KRINTUS M; SADLECKI P; GRABIEC M; MANKOWSKA-CYL A; SOKUP A; WALENTOWICZ-SADLECKA M. Serum inhibin A and inhibin B levels in epithelial ovarian cancer patients. **PLoS One**, 9, 3, 3–9, 2014.

WALLACE NA; KHANAL S; ROBINSON KL; WENDEL SO; MESSER JJ; GALLOWAY DA. High-Risk Alphapapillomavirus Oncogenes Impair the Homologous Recombination Pathway. **J. Virol.**, 91, 20, e01084-17, 15 out. 2017.

WALTON KL; MAKANJI Y; HARRISON CA. New insights into the mechanisms of activin action and inhibition. **Mol. Cell. Endocrinol.**, 359, 1–2, 2–12, 2012.

WANG JW; RODEN RBS. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. **Virology**, 445, 1–2, 175–186, 2013.

WARBURTON A; REDMOND CJ; DOOLEY KE; FU H; GILLISON ML; AKAGI K; SYMER DE; ALADJEM MI; MCBRIDE AA. HPV integration hijacks and multimerizes a cellular enhancer to generate a viral-cellular super-enhancer that drives high viral oncogene expression. **PLoS Genet.**, 14, 1, 2018.

WESTALL GP; SNELL GI; LOSKOT M; LEVVEY B; O'HEHIR R; HEDGER MP; KRETZER DM DE. Activin Biology After Lung Transplantation. **Transplant. Direct**, 3, 6, e159, 2017.

WIJAYARATHNA R; KRETZER DM DE. Activins in reproductive biology and beyond. **Hum. Reprod. Update**, 22, 3, 342–357, 2016.

WOO YL; STERLING J; DAMAY I; COLEMAN N; CRAWFORD R; BURG SH VAN DER; STANLEY M. Characterising the local immune responses in cervical intraepithelial neoplasia: A cross-sectional and longitudinal analysis. **BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.**, 115, 13, 1616–1621, 2008.

WRIGHT DK; MANOS MM. Sample Preparation from Paraffin-Embedded Tissues. *In*: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.). . **PCR Protoc. A Guid. to Methods Appl.** San Diego, CA: Academic Press, Inc, 1990. 153–158.

YAMAGUCHI A; HASHIMOTO N; TSUTAE W; SEINO K; EBINA Y; TOKINO T; SATO N; KIKUCHI K. Detection of human papillomavirus DNA by PCR/microfluorometry for screening of cervical cancer. **Clin. Chim. Acta**, 318, 1–2, 41–49, 2002.

ZABKIEWICZ C; RESAUL J; HARGEST R; JIANG WG; YE L. Increased expression of follistatin in breast cancer reduces invasiveness and clinically correlates with better survival. **Cancer Genomics and Proteomics**, 14, 4, 241–251, 2017.

ZHANG L; LIU K; HAN B; XU Z; GAO X. The emerging role of follistatin under stresses and its implications in diseases. **Gene**, 639, October 2017, 111–116, 2018.

ZHANG P; RUAN Y; XIAO J; CHEN F; ZHANG X. Association of serum follistatin levels with histological types and progression of tumor in human lung cancer. **Cancer Cell Int.**, 18, 1, 1–8, 2018.

ZHENG W; FADARE O; QUICK CM; SHEN D; GUO D. **Gynecologic and Obstetric Pathology.** [s.l.] Springer Singapore, 2019.