

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES
CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

PAULA CRISTINA DE VASCONCELOS VIEIRA

**AVALIAÇÃO DE RAP1 COMO BIOMARCADOR DAS
NEOPLASIAS CERVICAIS:
INTRAEPITELIAL E INVASORA**

Belo Horizonte

2019

PAULA CRISTINA DE VASCONCELOS VIEIRA

**AVALIAÇÃO DE RAP1 COMO BIOMARCADOR DAS
NEOPLASIAS CERVICAIS:
INTRAEPITELIAL E INVASORA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino

Coorientadoras: Prof^ª. Dra. Maria
Gabrielle de Lima Rocha
Prof^ª. Dra. Annamaria Ravara Vago

Belo Horizonte

2019

V658a Vieira, Paula Cristina de Vasconcelos.
Avaliação de RAP1 como biomarcador das neoplasias cervicais:
intraepitelial e invasora / Paula Cristina de Vasconcelos Vieira. – 2019.
157 f. : il.

Orientador: Adriano de Paula Sabino.
Coorientadoras: Maria Gabrielle de Lima Rocha.
Annamaria Ravara Vago.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises
Clínicas e Toxicológicas.

1. Neoplasia intraepitelial cervical – Teses. 2. Câncer – Teses. 3.
Biomarcadores – Teses. 4. Vírus papiloma – Teses. 5. Imuno-
histoquímica – Teses. I. Sabino, Adriano de Paula. II. Rocha, Maria
Gabrielle de Lima. III. Vago, Annamaria Ravara. IV. Universidade
Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 616.925



FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DE RAP1 COMO BIOMARCADOR DA NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL

PAULA CRISTINA DE VASCONCELOS VIEIRA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 29 de novembro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Adriano de Paula Sabino - Orientador
UFMG

Prof. Annamaria Ravara Vago
UFMG

Prof. Maria Gabrielle de Lima Rocha
UFMG

Prof. Marcelo Antonio Pascoal Xavier
UFMG

Prof. Helén Lima Del Puerto
UFMG

Colaboradores

- Prof^ª. Dra. Jaqueline Germano de Oliveira - Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas René Rachou
- Dr. Paulo Guilherme de Oliveira Salles – Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Luxemburgo
- Prof. Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais
- Dr. Alexandre Tafuri – Laboratório de Anatomia Patológica Tafuri

Dedico este trabalho a Deus, à minha família, em especial aos meus pais, Divino e Minervina, e ao meu marido, Samuel.

AGRADECIMENTOS

Devo toda a alegria desta vitória a Deus. A quem pude confiar e ter certeza de seus propósitos em minha vida.

Agradeço imensamente aos meus pais, Divino e Minervina, que vibraram por minhas conquistas e me apoiaram em minhas dificuldades.

Agradeço também à minha irmã, Cristiane, pelo carinho e incentivo. Aos meus sobrinhos, Inácio e João, pelos sorrisos que, constantemente alegam a minha vida.

Ao meu melhor amigo e companheiro, Samuel, por sempre estar comigo. Sem você não conseguiria chegar até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Adriano de Paula Sabino, pela contribuição e dedicação para realização deste trabalho.

As minhas coorientadoras, Prof^a Annamaria Ravara Vago e Prof^a Maria Gabrielle de Lima Rocha que se dedicam com amor à profissão que escolheram. Obrigada pelo carinho, apoio, incentivo e ensinamentos compartilhados.

À Prof^a Jaqueline Germano de Oliveira que, gentilmente, recebeu-me no seu laboratório. Obrigada pela valiosa contribuição e pelo apoio oferecido.

Ao colaborador Dr. Paulo Guilherme de Oliveira Salles pelas amostras utilizadas neste estudo.

Ao professor Marcelo Antônio Pascoal Xavier pela prontidão e crucial colaboração.

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

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG pelo companheirismo e ensinamentos, em especial a Katiane, pelo conhecimento compartilhado, pelo exemplo de inspiração e dedicação.

Às alunas de iniciação científica Helen e Karolina, pelo auxílio nos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Patogênese Molecular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Larissa Rodrigues Peixoto, Lara Verônica de Araújo Lopes, pelo companheirismo, dedicação, apoio e ensinamentos.

À Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas René Rachou.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Assistência hematológica Núcleo, por todo apoio e palavras de incentivo, em especial a Paula Fernandes, pela disponibilidade nas trocas de plantão que foram fundamentais para a realização de todas as atividades da pós-graduação.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.” (José de Alencar)”

RESUMO

Mundialmente, o carcinoma de colo uterino associado ao HPV está entre as maiores causas de morte relacionadas ao câncer na população feminina. Nos últimos anos, a detecção de lesões pré-neoplásicas mediante a ação de programas consolidados de rastreamento, prevenção e acompanhamento clínico, permitiram a redução das taxas de câncer de colo em diversos países. Entretanto, esta neoplasia ainda é muito frequente. Esse problema tem fortalecido a procura por biomarcadores que possam aumentar a eficiência do rastreamento. Entre estes biomarcadores está RAP1, pequena GTPases com atuação em múltiplas vias de Sinalização celular, e em processos neoplásicos. Por isso, avaliou-se nesse estudo, biópsias de colo uterino diagnosticadas por Histopatologia em Cervicites, Lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, (i) a expressão de RAP1 por Imuno-histoquímica nas áreas lesionadas do epitélio; (ii) a prevalência da infecção por HPV por meio da *Nested-PCR*, e a Genotipagem dos HPVs por Sequenciamento Automático de DNA. Neste estudo, a presença do DNA-HPV foi observada em 72 (73,74%) do total de 99 amostras, e o genótipo do HPV16 foi o mais prevalente nas amostras HPV positivas, especialmente em NIC III e Câncer. Em relação à RAP1 em tecidos cervicais, observou-se a expressão da proteína em amostras de todos os grupos analisados. A marcação esteve predominantemente no núcleo e no citoplasma de células epiteliais representando 69% do total de 90 amostras cervicais. Em relação ao parâmetro Intensidade da marcação, verificou-se que amostras de NIC III exibiram maior intensidade de RAP1, do que lesões de menor gravidade (Cervicites + NIC I). Nas amostras de Carcinoma de Células Escamosas também se observou a Imuno-marcação para RAP1 predominantemente intensa, com forte marcação nuclear. Percebe-se que nas lesões mais graves, NIC III e CCE a quantidade de núcleos marcados é mais elevada se comparado a lesões mais leves. Em conclusão, nosso estudo aponta o uso potencial da marcação tecidual de RAP1 como Biomarcador de lesões cervicais de maior gravidade, como NIC III e o Câncer cervical.

Palavras-chave: RAP1, Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), Câncer cervical, HPV, Imuno-histoquímica, Genotipagem do HPV.

ABSTRACT

Cervical cancer is one of the most important causes of cancer-related deaths among women Worldwide, and Human Papillomavirus (HPV) infection is present in 99% of cases. In the last years, detection of pre-neoplastic lesion through the action of well-succeeded programs of women's screening, prevention and clinical follow-up has permitted the reduction of incidence of and mortality from cervical cancer in several countries. However, this neoplasia is still very prevalent. This issue has intensified the search for biological markers or Biomarkers that could improve the sensibility and specificity of programs of women's screening. Among these BM is RAP1, a small GTPase with action in several cell signaling pathways and neoplastic processes. However, our study evaluated in biopsies collected from the uterine cervix of women diagnosed by Histopathology as Cervicitis, Pre-neoplastic and Neoplastic lesions, **(i)** the RAP1 expression in lesioned areas of cervical epithelium by Immuno-histochemistry methodology and; **(ii)** the prevalence of HPV infection by using a *Nested*-PCR protocol, and the HPV Genotyping by sequencing of a viral DNA fragment by using the Automatic DNA Sequencing technique. In this study, the presence of HPV-DNA was observed in 72 (73.74%) out of the 99 cervical tissues samples, and HPV16 was the most commonly genotype found among the HPV-positive samples, especially in samples from the Cervical Intra-epithelial Neoplasia (CIN) grade III and Cervical cancer groups. Concerning the RAP1 expression in cervical tissues from distinct diagnosis, the protein Immuno-labeling was observed in tissue samples from the all analyzed groups. The labeling was predominantly in both sites nucleus and cytoplasm of epithelial cells, representing 69% of the total 90 tissue samples. In relation to the parameter "Labeling intensity", it was verified that samples from the CIN III exhibited a higher intensity labeling for RAP1, than that observed in lesions of low-severity (CE + CIN I). In the samples of Cervical cancer tissues, it is also possible to detect a labeling pattern of high intensity RAP1 staining, with strong nuclear labeling. It is noticed that in the most lesions of high-severity, CIN III and Cervical cancer the number of nuclear labeling is higher when compared to lesions of low-severity. In conclusion, our study highlights the potential use of RAP1 tissue labeling, as a biomarker for the detection of cervical lesions of high severity, and cervical cancer.

Key words: RAP1, Cervical Intra-epithelial Neoplasia (CIN), cervical cancer, HPV, Imuno-histochemistry, HPV Genotyping.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore filogenética do HPV.	22
Figura 2 - Partículas de Papilomavírus	23
Figura 3 - Representação esquemática da organização do genoma do HPV16.....	25
Figura 4 - Representação esquemática da infecção por HPV e da neoplasia do epitélio cervical.....	28
Figura 5 - Fases da replicação do genoma viral do HPV	29
Figura 6 - Imagens representativas de secções de tecido cervical coradas por HE...34	
Figura 7 – Relação entre a incidência da infecção cervical pelo HPV e as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas	41
Figura 8 - Controle da atividade da proteína RAP1 GTPase via GEFs e GAPs.....	45
Figura 9 - Atuação da proteína RAP1 em neoplasias.....	48
Figura 10 – Fotomicrografias representativas das amostras cervicais utilizadas neste estudo com diferentes Diagnósticos Histopatológicos.....	67
Figura 11 - Verificação da presença do gene da β -globina humana nas amostras cervicais, por Eletroforese em géis de poliacrilamida 6% corados pelo Nitrato de Prata	68
Figura 12 - Verificação da presença do DNA-HPV nas amostras cervicais por Eletroforese em géis de poliacrilamida 6% corados pelo Nitrato de Prata.....	69
Figura 13 - Cromatograma parcial gerado pelo Sequenciador Automático Capilar ABI 3730 (Life Technologies)	72
Figura 14 - Expressão da proteína RAP1 em amostras de tecido cervical pela utilização da técnica de Imuno-histoquímica	75-77
Figura 15 - Avaliação do percentual das células reativas na Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais.....	80
Figura 16 - Avaliação do percentual das células reativas na Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais agrupadas conforme o risco da paciente evoluir para câncer.....	81
Figura 17- Avaliação do percentual das células reativas na Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras de CCE	82
Figura 18 - Avaliação da Distribuição das células reativas na Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 na espessura do epitélio cervical.....	84

Figura 19 - Avaliação da Distribuição das células reativas na Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais agrupadas conforme o risco da paciente evoluir para câncer.....	85
Figura 20 - Avaliação da intensidade da marcação por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais.....	87
Figura 21 - Avaliação da intensidade da marcação por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais agrupadas conforme o risco da paciente evoluir para câncer.....	88
Figura 22 - Avaliação da intensidade da marcação por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 em amostras cervicais de CCE	89
Figura 23 - Avaliação da localização celular por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais	91
Figura 24 - Avaliação da localização celular por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais agrupadas conforme o risco da paciente evoluir para câncer.....	92
Figura 25 - Avaliação da localização celular por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 em amostras cervicais de CCE	93
Figura 26 - Avaliação Semi-quantitativa da marcação nuclear por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais	95
Figura 27 - Avaliação Semi-quantitativa da marcação nuclear por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais agrupadas conforme o risco da paciente evoluir para câncer	96
Figura 28- Avaliação Semi-quantitativa da marcação nuclear por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais de CCE	97

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Componentes do Mix de PCR para amplificação do gene β -globina (268 pb)	155
Quadro 2 – Componentes do Mix de PCR para amplificação do gene β -globina (110 pb)	155
Quadro 3 – Programa de amplificação do gene β -globina (268 e 110 pb).....	155
Quadro 4 – Componentes do Mix de PCR para amplificação de um fragmento de 450 pb do genoma viral	156
Quadro 5 – Programa de amplificação do gene β -globina (268 e 110 pb)	156
Quadro 6 – Componentes do Mix de PCR para amplificação de um fragmento de 450 pb do genoma viral.....	156
Quadro 7 – Programa de amplificação do fragmento de 450 pb do genoma viral.....	157
Quadro 8 – Componentes do Mix de PCR para amplificação de um fragmento de 150 pb do genoma viral	157
Quadro 9 – Programa de amplificação do fragmento de 150 pb do genoma viral ...	158
Quadro 10 – Parâmetros considerados para marcação pela Imuno-histoquímica	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos de pacientes selecionados para o estudo	54
Tabela 2 - Classificação do grau de diferenciação das amostras de Câncer de Células Escamosas	55
Tabela 3 – Detecção do DNA-HPV por Nested-PCR nas amostras cervicais	70
Tabela 4 - Genotipagem do HPV detectado nos diferentes grupos de amostras	71
Tabela 5 - Amostras Cervicais que foram submetidas à análise Imuno-histoquímica (IHQ) para RAP1.....	73
Tabela 6 - Avaliação do Percentual das células reativas por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais.....	79
Tabela 7 - Avaliação da Distribuição das células reativas na Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 na espessura do epitélio cervical	83
Tabela 8 - Avaliação da Intensidade da marcação por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais.....	86
Tabela 9 - Avaliação da Localização celular por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais	90
Tabela 10 - Avaliação Semi-quantitativa da Marcação nuclear por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais	94

LISTA DE ABREVIATURAS

- ASC-US - *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*, tradução (Células Atípicas de Significado Indeterminado).
- cAMP - Adenosina 3',5'-Monofosfato Cíclico
- CCE - Carcinoma de Células Escamosas
- CCEP- Carcinoma de Células Escamosas Pouco diferenciado
- CCEM- Carcinoma de Células Escamosas Moderadamente diferenciado
- CE – Cervicite crônica inespecífica
- CEH - Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV
- CDK - *Cyclin- dependent kinase*, tradução (Ciclina Dependente de Kinase)
- DAB - Diamino-Benzidina 3,3
- DAG - Diacilglicerol
- DNA - Deoxyribonucleic Acid, tradução (Ácido Desoxirribonucleico)
- dNTP - Deoxynucleotide Triphosphates, tradução (Desoxinucleótido Trifosfato)
- E - *Early*, tradução (precoce)
- ECM - *Extracellular matrix*, tradução (matriz extracelular)
- FAFAR - Faculdade de Farmácia
- FFPE - *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded tissues*, tradução (Tecido fixado em formalina e incorporado em parafina)
- FIGO - *International Federation of Gynecology and Obstetrics*, tradução (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia)
- FM - Faculdade de Medicina
- GAPs - (*GTPase Activating Protein*), tradução (Proteínas Ativadoras de GTPase)
- GDP - Guanina Difosfato
- GEFs - *Guanine Nucleotide Exchange Factors*, tradução (fatores de troca de nucleotídeos de guanina)
- GPCR - *G-Protein–Coupled Receptor*, tradução (Receptores Acoplados à Proteína G)
- GTP - Guanina Trifosfato
- HE - Hematoxilina e Eosina
- HIV - *Human Immunodeficiency Virus*, tradução (vírus da imunodeficiência humana)
- HPV – *Human Papiloma Virus*, tradução (Papilomavírus humano)
- HSIL - *High Grade Squamous Intra-epithelial Lesion*, tradução (Lesão Intraepitelial cervical de alto grau)

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

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

ICR - Ion Channel Receptor, tradução (Receptores de canais de íons)

IHQ - Imuno-histoquímica

INCA - Instituto Nacional de Câncer

JEC - Junção escamo-colunar

L - Late, tradução (tardio)

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

LIEAG - Lesão Intraepitelial de alto grau

LIEBG - Lesão Intraepitelial de baixo grau

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

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

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

NCR - *Non-coding region*, tradução (região não codificadora)

NF- κ B - Fator Nuclear kappa B

NIC I - Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1

NIC II - Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 2

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

OMS - Organização Mundial de Saúde

ORFs - *Open Reading Frames*, tradução (fases de leitura aberta).

pb – Pares de base

PBS - *Phosphate-Buffered Saline*, tradução (Tampão fosfato-salino)

PCR - Polymerase Chain Reaction, tradução (Reação em Cadeia de Polimerase)

pRb - Proteína retinoblastoma

PVs - Papilomavírus

RTKs - *Receptor Tyrosin Kinases*, tradução (Receptores Acoplados à Tirosina Quinases)

SILs - *Squamous Intra-epithelial Lesions*, tradução (LIEs - Lesões Intra-epiteliais Escamosas)

T.A. - Temperatura Ambiente

TAE - Tris-Acetato-EDTA

TBE - Tris-Borato-EDTA

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

URR - *Upstream Regulatory Region*, tradução (Região reguladora a montante)

UV - Luz Ultravioleta

V - Volts

VEGFR2 - *Vascular endothelial growth factor receptor 2*, tradução (Receptor do Fator de Crescimento Vascular Endotelial 2)

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	20
2 - REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 - O Papilomavírus Humano.....	22
2.2 - Ciclo biológico do HPV.....	27
2.3 - Importância e epidemiologia da infecção pelo HPV.....	30
2.4 - Manifestações clínicas causadas pelo HPV no sistema genital feminino ..	31
2.5 - História natural na Neoplasia Intraepitelial Cervical	32
2.6 - Carcinogênese cervical e fatores de risco.....	35
2.7 - Epidemiologia do Câncer de colo do útero	38
2.8 - Prevenção da Neoplasia Intraepitelial Cervical e problemas em seu diagnóstico	40
2.9 - Aplicação clínica de biomarcadores na Neoplasia Intraepitelial Cervical ..	41
2.10 - Proteína RAP1	44
2.11- Expressão de RAP1 em tumores	47
3 - RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	51
4 - OBJETIVOS	53
4.1- Objetivos específicos	53
5 - METODOLOGIA	54
5.2 - Análise Histopatológica.....	55
5.3 - Análise molecular	56
5.3.1 - <i>Extração de ácidos nucleicos</i>	56
5.3.2 - <i>Amplificação do gene de β-globina e identificação da infecção por HPV</i>	57
5.3.3 - <i>Amplificação do gene β-globina humano</i>	59
5.3.4 - <i>Detecção do DNA do HPV pela Nested-PCR</i>	60
5.3.5 - <i>Genotipagem do HPV por Sequenciamento Automático</i>	61
5.4 - Reação de Imuno-histoquímica	62
5.5 - Avaliação das marcações por RAP1	63
5.6 - Aquisição de imagens	65
5.7- Análise estatística.....	65
6 - RESULTADOS	66
6.1 - Análise histopatológica	66

6.2 - Verificação da integridade do DNA extraído das amostras cervicais	68
6.3 - Prevalência da infecção por HPV	68
6.4 - Genotipagem do HPV nas Amostras Cervicais	70
6.5 - Análise Imuno-histoquímica da Expressão de RAP1	72
6.5.1 - Marcação por Imuno-histoquímica de RAP1 nas amostras cervicais	73
6.5.2 - Avaliação da Imuno-histoquímica por RAP1	78
6.5.2.1 - Avaliação da Imuno-histoquímica por RAP1 através do parâmetro Percentual das células reativas em amostras cervicais	78
6.5.2.2 - Avaliação da Imuno-histoquímica por RAP1 através do parâmetro Distribuição das células reativas em amostras cervicais	82
6.5.2.3 - Avaliação da Imuno-histoquímica por RAP1 através do parâmetro da Intensidade da marcação em amostras cervicais	85
6.5.2.4 - Avaliação da Imuno-histoquímica por RAP1 através do parâmetro Localização Celular da marcação em amostras cervicais	89
6.5.2.5 - Avaliação da Imuno-histoquímica por RAP1 através do parâmetro Semi-quantitativo da Marcação nuclear em amostras cervicais	93
7 - DISCUSSÃO	98
8 - CONCLUSÕES	105
9 - PERSPECTIVAS	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
ANEXO A - Carta de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais	143
ANEXO B – Emenda da Carta de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais	148
ANEXO C - Carta de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Luxemburgo	153
ANEXO D -	155

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma cervical permanece entre as maiores causas de morte relacionadas ao câncer na população feminina. Ocupa a quarta posição na mortalidade, seguindo os cânceres de mama, cólon-retal e de pulmão e a terceira posição na morbidade. É um grande problema de saúde pública. A maioria dos novos casos, acima de 85%, são diagnosticados em pessoas economicamente desfavorecidas e quase 90% das mortes por este câncer, ocorrem em regiões de baixos recursos econômicos.

É de consenso na literatura que o principal fator de risco para a carcinogênese cervical é a presença de infecção persistente pelo HPV de alto risco. Entretanto não é o único. Além de aspectos relacionados à própria infecção, como carga viral e frequência de integração e infecção única ou múltipla, fatores ligados ao hospedeiro, como a imunidade, a genética e o comportamento sexual, parecem influenciar os mecanismos que determinam a regressão ou a persistência da infecção. Portanto, o resultado da interação complexa entre infecção persistente por HPV de alto risco, fatores ambientais e fatores inerentes ao hospedeiro define a progressão ou não para o câncer de colo do útero.

O diagnóstico precoce de lesões pré-neoplásicas não invasivas é de grande interesse, já que a neoplasia cervical se desenvolve de forma lenta e progressiva. No Brasil, o controle do câncer de colo do útero tem sido realizado, principalmente, por programas de rastreamento que utilizam a citologia como ferramenta de triagem, em coletas periódicas e a vacina, como prevenção. Embora estes programas tenham reduzido de forma significativa a incidência, a prevalência e a mortalidade por este tumor, os números permanecem altos, o que torna necessário a pesquisa de novos biomarcadores com maior valor preditivo.

A busca por biomarcadores específicos e sensíveis é grande. Dentre os possíveis biomarcadores, a proteína GTPase RAP1 tem sido avaliada. Estudos demonstram que esta proteína atua como transdutor bioquímico nas vias de sinalização celular. No processo neoplásico, desempenha um papel ativo em eventos iniciais da transformação neoplásica. Alguns estudos demonstram que, por intermédio da ação de seus reguladores, ocorre a ativação aberrante de RAP1, o que leva ao aumento da proliferação celular e carcinogênese. Na neoplasia cervical, RAP1 tem

demonstrado grande potencial para biomarcador tumoral, mas os estudos ainda são escassos.

Atualmente, tem-se como desafio entender o papel desta proteína nas diversas neoplasias, traçar seus possíveis mecanismos de ação e avaliar sua função como biomarcador precoce de tumores.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - O Papilomavírus Humano

Os Papilomavírus (PVs) são um grande grupo de pequenos vírus encapsulados, não envelopados (WHO, 2019a). Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, pertencem a família *Papillomaviridae* (ICTV, 2019). São agrupados em gênero, espécie, tipos, subtipos e variantes de acordo com semelhança genômica existente na sequência de nucleotídeos da região mais conservada do genoma viral (porção do gene *L1*) (de VILLIERS *et al.*, 2004; BERNARD *et al.*, 2005; MORS HED *et al.*, 2014; EGAWA *et al.* 2015).

Até o momento, há aproximadamente 200 tipos de PVs que infectam humanos (HPV) (Papillomavirus Episteme: <http://pave.niaid.nih.gov/#home>). Estes HPVs estão distribuídos em cinco gêneros: *alfa-papilomavirus*, *beta-papilomavirus*, *gama-papilomavirus*, *Mu-papilomavirus* e *Nu-papilomavirus* (EGAWA *et al.* 2015; JIN & XU, 2015). O gênero clinicamente mais importante é o *alfa-papilomavirus* (de VILLIERS *et al.*, 2004; MORSHED *et al.*, 2014; EGAWA & DOORBAR, 2017) (Figura 1).

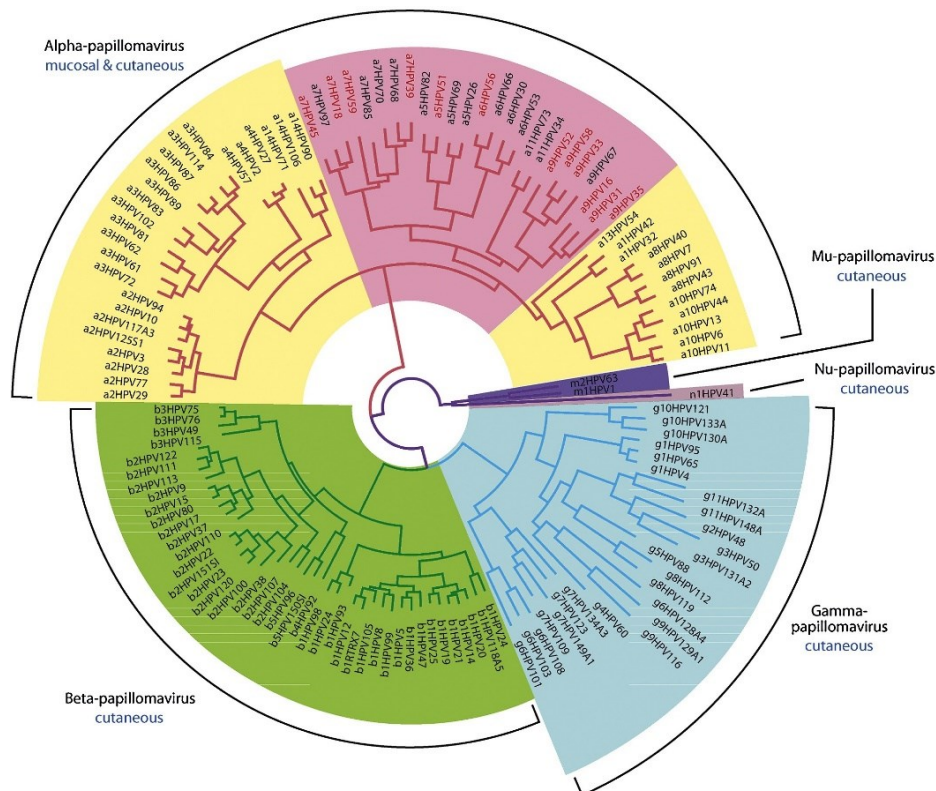


Figura 1 - Árvore filogenética do HPV. Os tipos de HPV encontrados em humanos se enquadram em cinco gêneros: *alfa-papilomavirus* (amarelo e rosa), *beta-papilomavirus* (verde), *gama-papilomavirus* (azul), *Mu-papilomavirus* (azul escuro) e *Nu-papilomavirus* (lilas). Os três primeiros

gêneros, representam os maiores grupos. No gênero *alfa-papilomavirus* há a representação dos tipos de HPV cutâneos e mucosos de baixo risco oncogênico (amarelo), e a representação de HPVs de alto risco oncogênico (rosa). Fonte: adaptado de EGAWA & DOORBAR 2017, p. 120.

Os HPVs também podem ser classificados de acordo com o tropismo epitelial, como mucosotrópicos ou cutâneos. Para cada tipo de HPV há propriedades genômicas e biológicas específicas. Portanto, são vírus espécie-específicos, manifestando patologias clínicas dependentes do genótipo viral (EGAWA & DOORBAR, 2017).

Dentre os HPVs mucosotrópicos, há cerca de 40 tipos que podem causar infecções anogenitais, os quais podem ser categorizados em três grupos a depender de seu potencial oncogênico. De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) os tipos de HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 foram classificados como carcinogênicos ou de alto risco; os tipos virais HPVs 26, 30, 53, 66, 67, 68, 69, 70, 82, 85 de possível risco carcinogênico e os tipos de HPVs 2, 6, 7, 11, 13, 27, 28, 29, 32, 40, 44, 57, 61, 62, 72, 74, 77, 81, 83, 84, 86, 87, 89, 90, 91, 106 de baixo risco ou não carcinogênicos (de VILLIERS *et al.*, 2004; DOORBAR *et al.*, 2012; IARC, 2012).

Essa força de indução ao câncer pode ser explicada pela forma como as oncoproteínas, dos diferentes tipos virais atuam no posicionamento e na regulação do promotor, bem como nos padrões de “*splicing*” de mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) e pela capacidade de se integrar ao genoma do hospedeiro. Essas diferenças alteram a expressão dos genes *E6* e *E7* que codificam as principais oncoproteínas virais, afetando assim a gravidade da lesão e suas chances de progressão (DOORBAR *et al.*, 2012; EGAWA & DOORBAR, 2017).

A estrutura viral do HPV é composta por um capsídeo icosaédrico, com diâmetro em torno de 55 nm e aproximadamente 2 nm de espessura (LETO *et al.*, 2011; MORSHED *et al.*, 2014; MEJÍA *et al.*, 2016) (**Figura 2**).

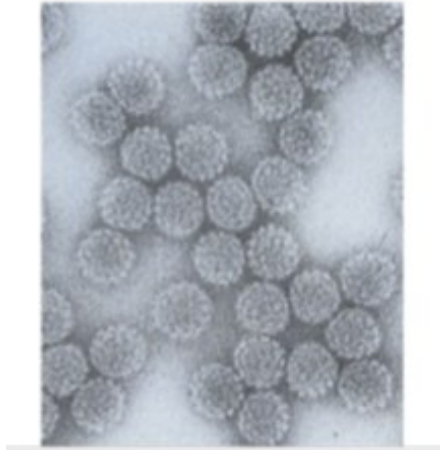


Figura 2 - Partículas de Papilomavírus. Micrografia eletrônica de partículas de papilomavírus coradas negativamente. Fonte: DOORBAR *et al.* (2015).

A estrutura do genoma viral só foi desvendada em 1963 (CRAWFORD & CRAWFORD, 1963). O HPV é um vírus de DNA (ácido desoxirribonucleico) de fita dupla, circular contendo cerca de 8.000 pares de bases. Seu genoma pode ser dividido em três diferentes regiões: a) Região não-codificadora denominada URR (*Upstream Regulatory Region*), LCR (*Long Control Region*) ou NCR (*Non-Coding Region*) (LETO *et al.*, 2011); b) Região precoce (E - *early*); c) Região tardia (L - *late*) (LIMA *et al.*, 2013; DOORBAR *et al.*, 2012; DOORBAR *et al.*, 2015) (**Figura 3**).

A região URR é situada entre as regiões codificadoras precoce e tardia (ZHENG & BAKER, 2006; CAMARA *et al.*, 2008; NAKAGAWA *et al.*, 2010). É uma região não codificadora composta por cerca de 400 a 900 pares de base. Nessa região localizam-se a origem da replicação viral, os sítios de ligação para fatores de transcrição e proteínas reguladoras (HAUSEN, 2000; LIMA *et al.*, 2013).

A região E é uma região codificadora, que contém cerca de seis janelas abertas de leitura (ORFs- *Open Reading Frames*). É denominada região inicial ou precoce por apresentar genes virais expressos no início da infecção. Nela há a transcrição de proteínas multifuncionais relacionadas ao controle da replicação e transcrição viral (ZHENG & BAKER, 2006; ROSA *et al.*, 2009; FERRAZ *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2013; DOORBAR *et al.*, 2015).

A região L é uma região codificadora com presença de genes expressos na fase tardia da infecção viral (ZHENG & BAKER, 2006) (**Figura 3**). Nela há duas ORFs denominadas de L1 e L2 que são responsáveis pela codificação de proteínas do mesmo nome, L1 e L2 respectivamente. Essas proteínas compõem o capsídeo viral, sendo L1 a proteína estrutural principal e L2 a menos representativa. Essas proteínas

são responsáveis pela imunogenicidade do vírus e carregam determinantes antigênicos gênero-específicos. Este conhecimento é de extrema importância, já que possibilitou o avanço do desenvolvimento das vacinas profiláticas (CAMARA *et al.*, 2008; ROSA *et al.*, 2009; LETO *et al.*, 2011, DOORBAR *et al.*, 2015).

A transcrição do genoma viral ocorre somente em um sentido (no sentido horário no mapa circular) uma vez que somente uma das fitas do DNA viral apresenta ORFs (LIMA *et al.*, 2013).

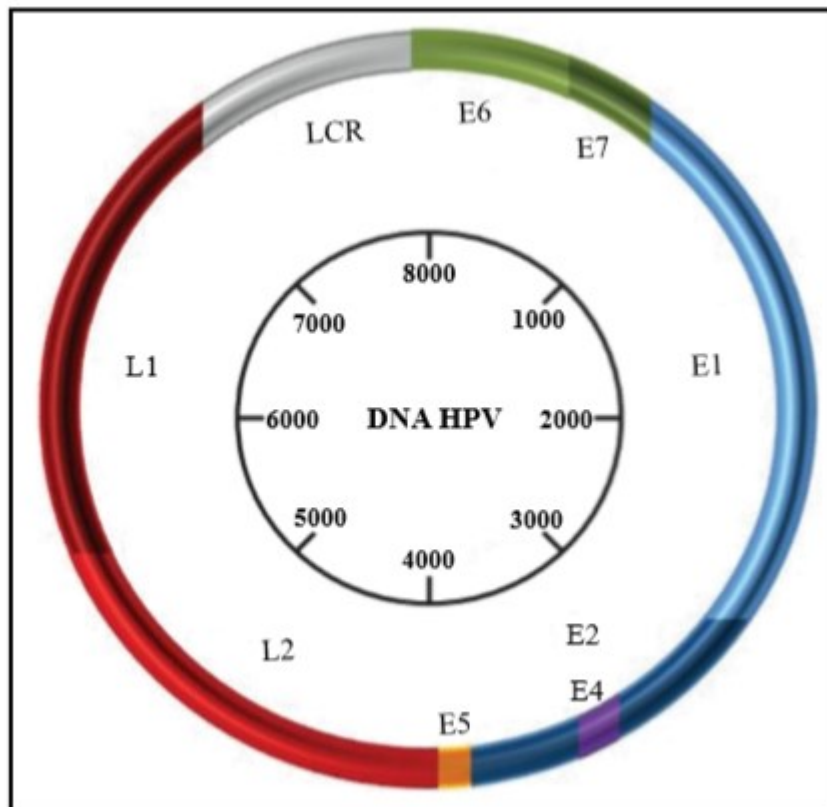


Figura 3- Representação esquemática da organização do genoma do HPV16. O genoma do HPV consiste em uma fita dupla de DNA circular (tamanho 8Kb) dividida em três regiões distintas: (I) região não-codificadora (LCR), (II) a região precoce e (III) a região tardia. A LCR abriga locais de ligação para as proteínas reguladoras E1 e E2, bem como para fatores de transcrição celular. Na região precoce há a codificação dos genes *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7* e, na região tardia, há a codificação dos genes *L1* e *L2*. Fonte: Adaptado de TSAKOGIANNIS *et al.*, 2017.

As proteínas virais E1 e E2 estão diretamente envolvidas na proliferação viral (REINSON *et al.*, 2015). A proteína E2 se liga cooperativamente com E1 formando um complexo tetrâmico para a iniciação da replicação do DNA viral (WHITE *et al.*, 2003; SCHUCK *et al.*, 2013). Quando formado, esse complexo se liga em regiões ricas em adenina-timina (A-T) da região LCR, o que possibilita a replicação do genoma viral através da interação e do deslocamento dos fatores de replicação do hospedeiro para

a ORF viral (KING *et al.*, 2010). A proteína E2 atua também como repressor da transcrição gênica de E6 e E7 e, quando expressa em níveis muito elevados, é capaz de induzir a apoptose (RAJ *et al.*, 2004; SCHUCK *et al.*, 2013).

O gene E4 é expresso abundantemente durante os últimos estágios do ciclo de vida viral. A proteína E4 está relacionada com a maturação, montagem, liberação e/ou a transmissão das partículas virais (GRIFFIN *et al.* 2012; MORSHED *et al.*, 2014; EGAWA *et al.* 2015). A proteína E4, age rompendo a rede de queratina citoplasmática do citoesqueleto sendo, por isso, responsável pelo desenvolvimento de uma cavitação denominada de coilócito, achado citopático compatível com a infecção pelo HPV (OLIVEIRA *et al.* 2003; GOMES, 2012; LOPES, 2014; MORSHED *et al.*, 2014).

As proteínas E6, E7 e E5 são relacionados à transformação celular. A proteína E5 é uma pequena proteína hidrofóbica transmembrana com papel na proliferação celular, mimetizando a ação de fatores de crescimento. Atua também na evasão da resposta imune celular do hospedeiro, modulando diversos mecanismos do sistema imune, incluindo apresentação de antígenos e vias inflamatórias (DOORBAR *et al.*, 2012; MORSHED *et al.*, 2014; DOORBAR *et al.*, 2015; WANG, X., *et al.*, 2018).

As proteínas E6 e E7 desregulam o ciclo celular por interação e inativação de proteínas de genes supressores de tumor, ciclinas e cinases dependentes de ciclina. Favorecem dessa forma, a replicação viral nas células do hospedeiro mesmo naquelas sob diferenciação terminal (PAULINO JÚNIOR *et al.*, 2011). Interferem na síntese de DNA, em grande parte, por inativar p53 e a proteína do retinoblastoma (pRb), respectivamente.

A oncoproteína E6 interage com o supressor do tumor celular p53 marcando-o (ubiquitinação) para degradação rápida nos proteassomos. Devido a este mecanismo, p53 deixa de exercer sua função no controle do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose, levando a célula à instabilidade genômica e mutações somáticas. Além disso, atua no crescimento celular sem ancoragem à matriz extracelular (ECM, sigla inglesa para *Extracellular Matrix*), e na ativação da telomerase o que promove imortalização celular (ELEUTÉRIO JUNIOR *et al.*, 2006; PINTO & QUEIROZ, 2013; JIN & XU, 2015; LONGATTO FILHO *et al.*, 2015).

A oncoproteína E7 se liga a mais de 20 alvos celulares e interfere com numerosos processos na célula. Está envolvida na evasão da vigilância imunológica do hospedeiro e, assim como a proteína E6, atua na transformação maligna e no crescimento celular independente de ancoragem à ECM. Liga-se à forma

hipofosforilada da pRb, ligação que altera o complexo formado entre a pRb e o fator de transcrição E2F. Quando livre estimula a transcrição de genes cujos produtos são necessários para a entrada na fase S do ciclo celular, levando assim à desregulação do ciclo celular e da replicação do DNA (RAJ, et al., 2004; PAULINO JÚNIOR *et al.*, 2011; JIN & XU, 2015).

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

2.2 - Ciclo biológico do HPV

Os HPVs apresentam tropismo por células epiteliais, e dependem da diferenciação destas para completar seu ciclo de vida (**Figura 4**). Eles infectam diferentes epitélios, sendo o epitélio estratificado escamoso não queratinizado da ectocérvice e o epitélio simples colunar da endocérvice, seus alvos no colo do útero. Um modelo para a infecção viral no tecido ectocervical consiste na entrada do vírus por meio de fissuras ou micro lesões existentes neste epitélio promovidas pelo ato sexual. Estas micro lesões expõem a camada basal do epitélio escamoso estratificado não queratinizado permitindo a infecção das células basais. O HPV também pode infectar as células metaplásicas que surgem ocasionalmente na região da junção escamo-colunar (JEC), e as células de reserva do epitélio simples colunar da endocérvice. A região da JEC é considerada uma região de alto potencial de transformação celular. Todas as células alvo deste vírus são indiferenciadas, e capazes de se dividirem ativamente (DOORBAR, 2005; CHOW L. *et al.*, 2010; LETO *et al.*, 2011; DOORBAR *et al.*, 2015; EGAWA *et al.* 2015; DURZYNSKA *et al.*, 2017; IARC, 2019a).

Alguns estudos propõem o envolvimento dos receptores de Sulfato de Heparan situados na superfície das células do hospedeiro, que possibilitariam a ligação inicial do vírus à célula. Essa ligação ocorreria através da proteína viral L1 aos receptores celulares (PEREIRA *et al.*, 2007; EGAWA *et al.*, 2015; PINIDIS *et al.*, 2016).

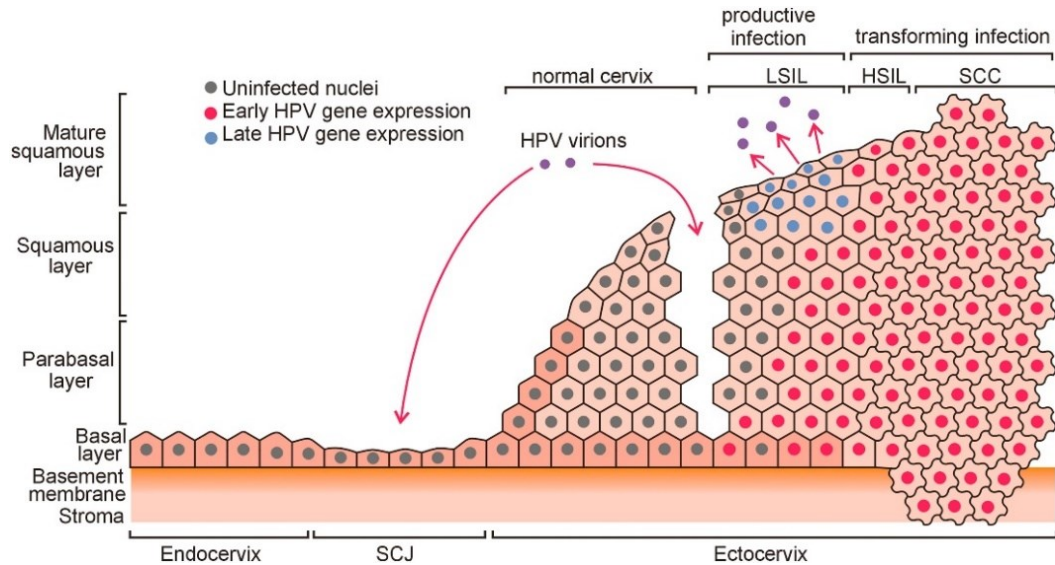


Figura 4- Representação esquemática da infecção por HPV e da neoplasia do epitélio cervical. Após a infecção, na camada basal do epitélio, o ciclo viral produtivo do HPV começa com a expressão de genes precoces. O genoma circular e episossomal, é mantido em um nível baixo de cópias por célula. Na camada parabasal, os oncogenes *E6* e *E7* são expressos, subvertem as vias regulatórias de controle da proliferação celular e impedem a diferenciação celular. Em camadas epiteliais superiores, os genomas virais são replicados com maior eficiência. Há a síntese de proteínas tardias L1 e L2, que compõem o capsídeo viral, e a montagem das partículas virais no núcleo. Após a montagem, há a liberação de vírions em camadas epiteliais completamente diferenciadas (Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau - LSIL). Com a infecção persistente por HPV e a integração do DNA viral no genoma do hospedeiro, a expressão dos genes precoces é desregulada e a expressão de genes tardios é perdida, instalando-se a Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL). Em consequência, há instabilidade genômica nas células epiteliais, acúmulo de mutações e aumento da replicação celular. Com a progressão da lesão, pode ocorrer o carcinoma invasor, onde as células completamente transformadas adquirem propriedades móveis, e podem romper a barreira da Membrana basal e invadir outros tecidos. Fonte: DURZYNSKA *et al.*, 2017.

Após a internalização do vírus o vírion perde o seu capsídeo, o que possibilita que o DNA viral seja transportado para o núcleo. Já no núcleo, o DNA viral sofre ação de fatores nucleares que interagem com a região LCR do vírus, ativando a transcrição do genoma viral. Assim, há a expressão dos genes precoces, principalmente *E1* e *E2* (HUBERT & LAIMINS, 2002; LOPES, 2014; MORGAN *et al.*, 2017).

No início do processo infeccioso, o vírus se mantém em baixo número de cópias virais, cerca de 50-300 cópias por célula. Essa fase da infecção é denominada infecção assintomática ou latente, sendo que a replicação viral fica restrita ao ciclo de divisão celular (PARK & ANDROPHY, 2002; OZBUN, 2002; CAMARA *et al.*, 2008; ROSA *et al.*, 2009; DOORBAR *et al.*, 2012; FERRAZ *et al.*, 2012; FISHER, 2015; DE SANJOSE *et al.* 2018).

Após essa fase de latência, o HPV pode iniciar a fase produtiva da infecção, ativando a maquinaria do hospedeiro necessária para permitir a proliferação viral. O tempo de duração da fase latente pode variar de indivíduo para indivíduo. Acredita-se

que devido a alguma fragilidade imunológica, o HPV saia do estado de latência e entre em estado replicativo. Nesta fase produtiva da infecção, partículas virais são formadas independentemente do ciclo de divisão celular, embora vinculadas à sua maturação (GRM *et al.*, 2009; DOORBAR *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2013; MORGAN *et al.*, 2017). Durante a fase produtiva, a expressão de *E6* e *E7* é mantida, havendo aumento da expressão dos genes tardios para a formação de vírions nas células maduras. O aumento na expressão de *E1* e *E2* se torna necessário para o aumento do número de cópias virais (DOORBAR *et al.*, 2012). Com a expressão aumentada de *E1*, transcritos aberrantes se formam (replicação “onion-skin”) e geram um conjunto de fragmentos do genoma do vírus que são ativamente modificados, recombinados e degradados pelo hospedeiro o que ameaça a estabilidade do genoma viral, sendo este um possível gatilho para a sua integração (MÄNNIK *et al.*, 2002; KADAJA *et al.*, 2007; NACHAJOVA *et al.*, 2015). Após a formação dos vírions, o vírus deve sair de dentro da célula e sobreviver no meio extracelular para uma próxima infecção (FISHER, 2015) (**Figura 5**).

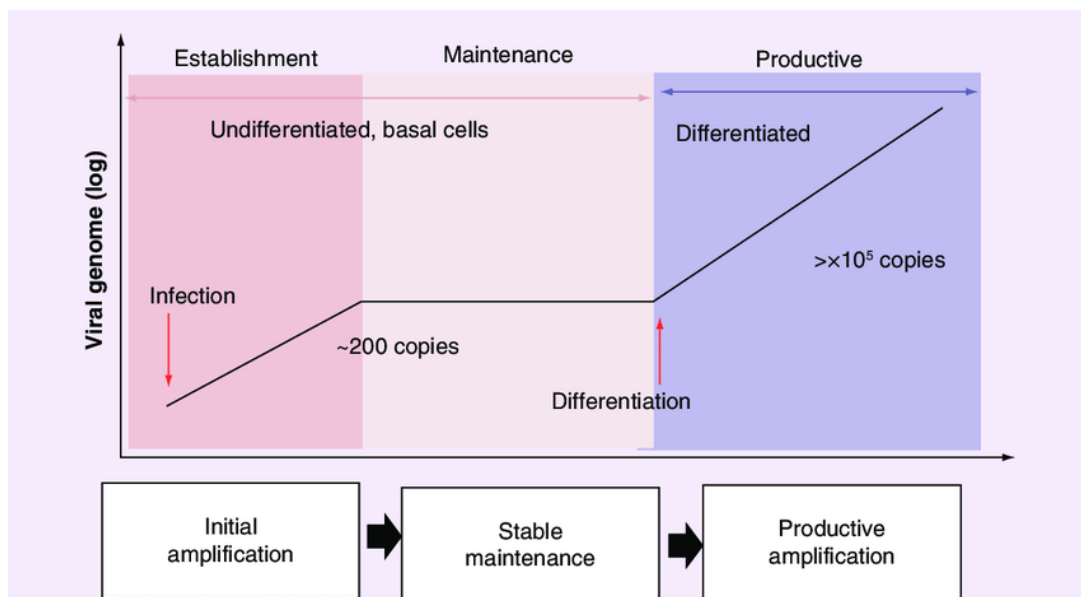


Figura 5- Fases da replicação do genoma viral do HPV. Após a infecção, na camada basal do epitélio, o DNA do HPV se apresenta em um nível baixo de cópias por célula (50-200). Este número de cópias é mantido até a fase produtiva. A fase produtiva é caracterizada por uma segunda amplificação de DNA onde partículas virais são formadas (acima de 100.000 cópias). Após a formação dos vírions, o HPV é liberado de dentro da célula. Fonte: Adaptado de NAKAHARA & KIYONO, 2016.

2.3 - Importância e epidemiologia da infecção pelo HPV

Na década de 70, o infectologista alemão Zur Hausen, ao notar similaridade dos padrões epidemiológicos das verrugas genitais e de pele, propôs a hipótese de que os HPVs participavam da etiologia destas verrugas e das neoplasias de colo uterino (ZUR HAUSEN, 1997). A partir de então, houve um crescente número de estudos da capacidade tumorigênica deste vírus. Em 1992, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu o HPV como o agente etiológico do processo de carcinogênese cervical.

Mundialmente, o HPV é a infecção viral mais comum do trato reprodutivo (WHO, 2019b). O risco da aquisição do HPV é fortemente influenciado por marcadores sexuais, como a existência de elevado número de parceiros sexuais, frequência e início precoce da vida sexual (PINTO & QUEIROZ, 2013). Em um estudo de meta-análise realizado por Bruni e colaboradores (2010) foi estimado que no mundo, o número de mulheres infectadas pelo HPV com achados citológicos normais, é de aproximadamente 12%.

A infecção genital pelo HPV pode ocorrer em qualquer idade (CUTTS *et al.* 2007), sendo que sua aquisição diminui no decorrer do envelhecimento das mulheres (MUÑOZ *et al.*, 2004; CASTLE *et al.*, 2005). Alguns estudos demonstram uma distribuição bimodal da infecção pelo HPV, com um pico na idade de 20 anos e um segundo pico na idade de 45-50 anos. Estes casos são observados especialmente em populações de alto risco para o carcinoma cervical (MOLANO *et al.*, 2002; CUTTS *et al.*, 2007).

Além do câncer do colo uterino, há fortes evidências de que o HPV é o agente etiológico para os cânceres de pênis, vulva, vagina, ânus, cabeça e pescoço. Sendo assim, o HPV é responsável por 4,5% (630.000) de todos os novos casos de câncer em todo o mundo (DEPUYDT, *et al.* 2017; SERRANO *et al.*, 2018). No câncer de colo uterino o HPV está presente em mais de 99% dos casos (WANG, X. *et al.*, 2018).

Os sorotipos mais frequentes de HPV de alto risco são diferentes entre países e etnias, e dependentes de fatores socioeconômicos. Entretanto, o HPV16 e o 18 têm se mostrado como os mais prevalentes e contribuem por mais de 70% de todos os casos de câncer do colo uterino, entre 41%-67% de lesões de alto grau e 16-32% de lesões de baixo grau (CLIFFORD *et al.*, 2006; WANG, X. *et al.*, 2018; BRUNI *et al.*, 2019). Só o HPV16 contribui com cerca de 50% dos casos de câncer. Outros tipos virais de alto risco também são relacionados ao câncer cervical como os 31, 33, 35, 45, 52 e 58; estes representam acima de 20% das neoplasias do colo do útero em

todo o mundo (CLIFFORD *et al.*, 2006; WANG, X. *et al.*, 2018). Os mais prevalentes HPVs de baixo risco oncogênico são os tipos 6 e 11, encontrados em cerca de 90% dos condilomas acuminados (HAWKINS *et al.*, 2013; PINTO & QUEIROZ, 2013).

Apesar da disponibilidade de múltiplas estratégias preventivas, o câncer relacionado ao HPV continua sendo uma das principais causas de morbimortalidade em muitas partes do mundo, particularmente nos países menos desenvolvidos que não possuem programas eficazes de rastreamento (SERRANO *et al.*, 2018).

Além disso, os custos relacionados ao diagnóstico e ao tratamento de doenças associadas ao HPV têm um grande impacto nos Sistemas de Saúde (BURLAMAQUI *et al.*, 2017). Em um estudo de Chow I. e colaboradores (2010), foi relatado que a triagem de Papanicolaou, em combinação com testes de DNA para o HPV, podem consistir em um dos programas mais efetivos economicamente. Além disso, outros estudos demonstraram que a vacinação em combinação com a triagem de Papanicolaou, tem boa relação custo-efetividade em vários programas de rastreamento por todo o mundo (CHEN *et al.*, 2011; BURGER *et al.*, 2014; BURLAMAQUI *et al.*, 2017).

2.4 - Manifestações clínicas causadas pelo HPV no sistema genital feminino

No trato genital feminino, a infecção pelo HPV pode ocorrer no colo uterino, vagina e vulva. As formas de manifestação da infecção podem ser: clínica e subclínica, onde existem lesões associadas à infecção por HPV ou latente, onde não existe nenhuma alteração macroscopicamente visual apesar do tecido se encontrar infectado (JUCKETT & HARTMAN-ADAMS, 2010; PAULINO JÚNIOR *et al.*, 2011).

A manifestação clínica é a menos predominante e é a mais facilmente detectada. Pode ser realizada pela visualização a olho nú de uma verruga denominada tecnicamente de condiloma acuminado. Esta lesão, corre com maior frequência na faixa etária de 15 a 24 anos (ARISTA *et al.*, 2019), e está frequentemente associada à presença dos HPVs de baixo risco 6 e 11, sendo estes responsáveis por cerca 90% dos casos (HAWKINS *et al.* 2013). Múltiplas infecções com HPVs de alto risco oncogênico, principalmente HPVs 16 e 18, podem ser encontradas, juntamente com os HPVs 6 e 11 (CHAN *et al.*, 2009; BALL *et al.*, 2011).

Entretanto, a infecção pelo HPV é frequentemente assintomática e pode passar despercebida pelo paciente, mesmo que uma lesão esteja presente (CASTRO *et al.*, 2009; FEDRIZZI, 2012). No carcinoma invasor, os sintomas dependem do tamanho do tumor e do grau de estadiamento. Em geral, as pacientes queixam-se de corrimento, dispareunia (transtorno que causa dor durante ou após o sexo) e sangramento genital (PAULINO JÚNIOR *et al.*, 2011).

A forma subclínica, lesão mais frequente no colo do útero que acomete 80% dos casos, é diagnosticada pela Colposcopia após aplicação de ácido acético a 5% ou pelo teste de Schiller. Esta forma, também denominada de condiloma plano, pode ter natureza benigna ou maligna. Esta natureza só pode ser determinada pela Citologia ou pela Biópsia seguida da Histopatologia e, quando maligna está sempre associada ao HPV (CASTRO *et al.*, 2009; PAULINO JÚNIOR *et al.*, 2011).

Já a forma latente, devido à ausência de lesões, tem o diagnóstico da infecção viral condicionada à realização de testes de Biologia Molecular como a Hibridação *in situ*, a Captura Híbrida ou a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); (CASTRO *et al.*, 2009; PAULINO JÚNIOR *et al.*, 2011).

2.5 - História natural na Neoplasia Intraepitelial Cervical

A neoplasia cervical é geralmente precedida por uma longa fase de doença pré-invasiva, caracterizada microscopicamente como uma série de eventos que progridem desde a atipia celular até vários graus de displasia. Essa fase precursora é geralmente assintomática e pode ocorrer por um período de 10 a 20 anos (MARTIN & O'LEARY, 2011).

As Neoplasias Intra-epiteliais Cervicais (NICs) são lesões proliferativas com maturação anormal e atipias de graus variáveis, substituindo parte ou toda a espessura do epitélio escamoso cervical. Segundo a classificação de Bethesda, na Citologia, as lesões precursoras cervicais recebem o nome de Lesões Intra-epiteliais Escamosas de Alto Grau (HSIL, sigla inglesa para *Low-grade squamous Intraepithelial lesion*) e correspondem na Histologia à Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau II (NIC II) e Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau III (NIC III). Lesões mais simples, classificadas na Citologia como Lesões Intra-epiteliais escamosa de Baixo Grau (LSIL, sigla inglesa para *Low-grade Squamous Intra-epithelial Lesion*), na Histologia

correspondem à Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau I (NIC I); (PAULINO JÚNIOR *et al.*, 2011).

Histologicamente, a categorização das NICs em graus I, II e III, depende da proporção de células maduras e diferenciadas na espessura do epitélio. Na presença de graus mais severos de NIC, há uma proporção maior de células indiferenciadas, na espessura do epitélio, com a camada superficial delgada composta por células maduras e diferenciadas (AIDÉ *et al.* 2009; IARC, 2019b) (**Figura 6 C-D**).

Assim, histologicamente, a NIC I é caracterizada pela presença de células neoplásicas indiferenciadas localizadas no terço inferior do epitélio escamoso. Alterações citopáticas devido à infecção pelo HPV, podem ser observadas em toda a espessura do epitélio (**Figura 6 B**). Já na NIC II há a presença de alterações celulares neoplásicas que ocupam os dois terços inferiores desse epitélio (**Figura 6 C**). Na NIC III, as células atípicas comprometem mais de dois terços ou toda a espessura do epitélio (**Figura 6 D**). As NIC I, NIC II e a NIC III correspondem, respectivamente, à displasia leve, displasia moderada e displasia acentuada/Carcinoma *in situ* (AIDÉ *et al.* 2009, IARC, 2019b).

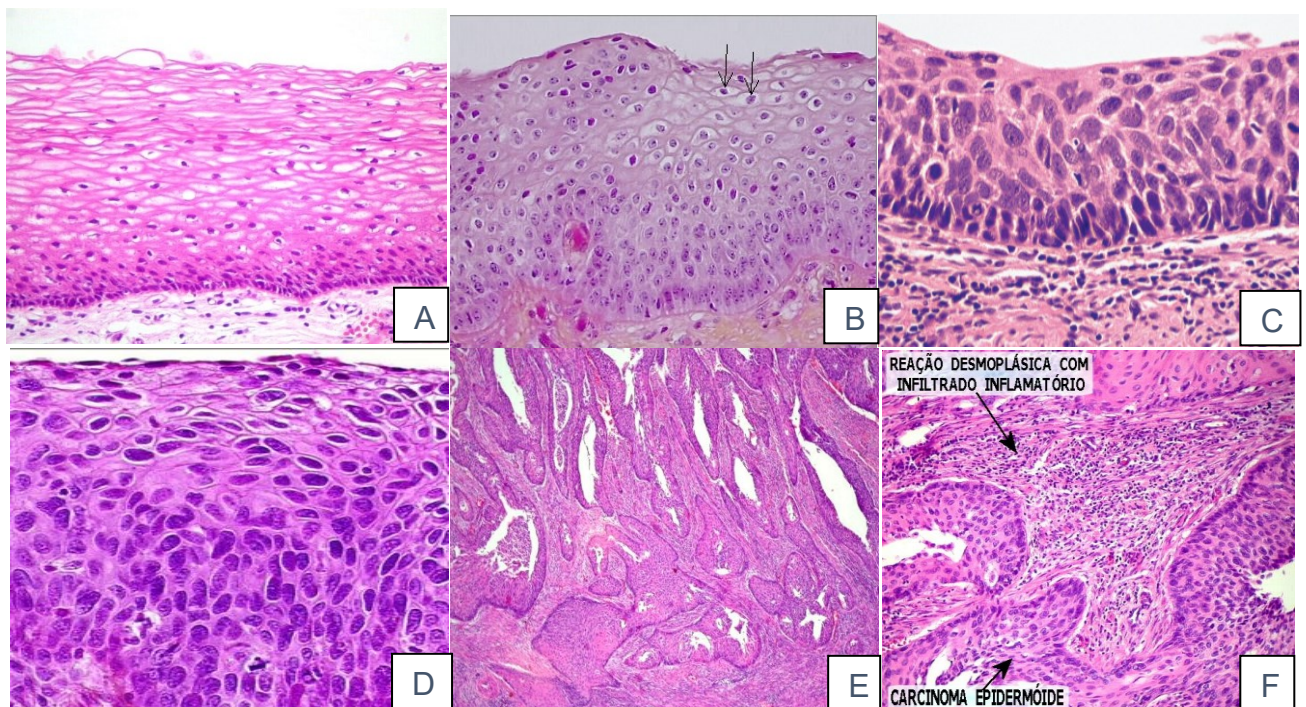


Figura 6- Imagens representativas de secções de tecido cervical coradas por HE. A: Epitélio cervical normal. B: Imagem histológica de NIC I- presença de boa maturação celular com anomalias nucleares mínimas; as células indiferenciadas estão confinadas às camadas mais profundas (terço inferior) do epitélio e há poucas figuras mitóticas. Presenças de coilócitos são indicadas pelas setas. C: Imagem histológica de NIC II- Lesão caracterizada por alterações celulares neoplásicas, principalmente restritas à metade inferior ou aos dois terços inferiores do epitélio, com

anormalidades nucleares mais acentuadas do que na NIC I. D: Imagem histológica de NIC III- A diferenciação e a estratificação podem estar totalmente ausentes ou presentes apenas no quarto superficial do epitélio, com numerosas figuras mitóticas. Anormalidades nucleares se estendem por toda a espessura do epitélio e há perda de polaridade das células. E- F: Imagem histológica do Carcinoma epidermoide – presença de ninhos sólidos de células com graus variados de diferenciação. Há extensa infiltração da massa neoplásica no estroma, reação desmoplásica (produção de tecido fibroso induzida pelo tumor) e reação inflamatória crônica inespecífica. Fonte: Adaptado de HARMON & KUMARASEN, 2009; Anatomia Patológica UNICAMP 2019; IARC 2019b.

Na literatura, diversos autores estudam as NICs com ênfase na regressão, persistência e progressão dessas lesões (OSTÖR, 1993; COLIE *et al.* 2018, TAINIO *et al.*, 2018, ZHANG & LU, 2019). Lesões menos graves como a NIC I, regredem espontaneamente na maioria dos casos. Mas para lesões de alto grau (NIC II ou NIC III) as chances de progressão ao câncer cervical são maiores (ZHANG & LU, 2019).

Atualmente, a NIC I é reconhecida como um diagnóstico histológico de replicação viral benigno em que não há necessidade de tratamento, já que há grandes chances de regressão (MARTIN & O'LEARY, 2011; TAINIO *et al.*, 2018). A maioria das NICs I regride entre o período de 12 a 24 meses (MELNIKOW *et al.*, 1998; SCHIFFMAN *et al.*, 2007).

Em um estudo realizado por HU e colaboradores (2017), em seis anos de acompanhamento foi demonstrado que somente 7% das mulheres, entre a idade de 35 a 45 anos, diagnosticadas por NIC I, progrediram para NIC II. Outros autores observaram que a regressão de NIC I é de aproximadamente 75%. Em adolescentes e mulheres abaixo de 25 anos de idade, a taxa de regressão chega a 90% (COX *et al.*, 2003; MOSCICKI *et al.*, 2004; MOSCICKI *et al.*, 2010).

Alguns estudos de meta análise apontam que a maioria das lesões de NIC II, particularmente em mulheres jovens, também regredem espontaneamente (TAINIO *et al.*, 2018; ZHANG & LU 2019). Segundo Moscicki e colaboradores (2010) em um estudo de coorte prospectivo entre mulheres de 18 a 23 anos, foi encontrada uma taxa de regressão de 63%. Apenas 15% das mulheres jovens evoluíram para NIC III em três anos. Devido à alta taxa de regressão, pode haver uma tendência ao não tratamento de lesões de NIC II, principalmente em mulheres jovens (CASTLE *et al.*, 2009). Segundo Ostör (1993) a taxa de regressão de NIC III foi estimada em torno de 32% e a progressão para câncer invasivo em até 12%.

Além disso, é descrito que o risco no desenvolvimento e progressão das NICs está relacionado ao tipo viral infectante. KJÆR e colaboradores (2010) descrevem que mulheres acometidas por infecção persistente pelo HPV16 têm cerca de 5% de

risco de desenvolverem NIC III ou lesão mais grave em três anos, e 20% de risco em dez anos. Quando a infecção persistente for por outros tipos de HPV oncogênico, esse risco reduz pela metade.

2.6 - Carcinogênese cervical e fatores de risco

Atualmente, é de consenso na literatura mundial, que a presença de infecção persistente por HPV de alto risco não é suficiente para explicar todos os eventos da carcinogênese, apesar de ser esse o fator mais importante (CECCATO JUNIOR *et al.*, 2015; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2015; GRAVITT & WINER, 2017). O resultado da interação complexa entre infecção persistente por HPV de alto risco, fatores ambientais e fatores inerentes ao hospedeiro determina a regressão ou a persistência da infecção, e também a progressão para lesões precursoras ou câncer (PINTO & QUEIROZ, 2013; INCA, 2019a).

Entre os fatores da carcinogênese cervical relacionados com o hospedeiro estão a ação dos hormônios endógenos, a presença da junção escamo-colunar, o tipo de flora associada, as alterações genômicas do hospedeiro (herdadas e adquiridas) e a sua resposta imune (GAO *et al.*, 2011; MOTEVASELI *et al.*, 2013; PAULINO JÚNIOR *et al.*, 2011; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2015; TAN & ANKATHIL *et al.*, 2015). Entre os fatores exógenos estão especialmente o uso de tabaco e de contraceptivos orais; a multiplicidade de parceiros e a dieta; a presença de traumatismo cervical e de coinfeção com o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e outros agentes sexualmente transmissíveis (GAO *et al.*, 2011; PAULINO JÚNIOR *et al.*, 2011; MOTEVASELI *et al.*, 2013; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2015; TAN & ANKATHIL *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.* 2017).

Em relação aos fatores associados ao vírus, a persistência da infecção, a taxa de integração viral ao genoma do hospedeiro, o tipo viral e a carga viral são os mais importantes (GAO *et al.*, 2011; PAULINO JÚNIOR *et al.*, 2011; MOTEVASELI *et al.*, 2013; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2015; TAN & ANKATHIL *et al.*, 2015).

Na persistência viral é descrito que a maioria das infecções pelo HPV são transitórias e o *clearance* ocorre dentre 12–24 meses após a exposição. Estima-se que 20% das mulheres e 6% dos homens desenvolvem infecção persistente pelo HPV o que leva à progressão da doença (GIULIANO *et al.*, 2008; MIRANDA *et al.* 2013;

SHANMUGASUNDARAM & YOU, 2017). Na literatura são descritos alguns fatores que levam a persistência viral tais como: o hábito de fumar (HAUKIOJA *et al.*, 2014), o consumo de bebidas alcoólicas (OH *et al.* 2014), o uso de contraceptivos orais, a susceptibilidade genética (WANG S. & HILDESHEIM, 2003; MOSCICKI *et al.* 2012), os mecanismos de evasão à resposta imune (STERN, 2005; HERNANDEZ-MONTES *et al.*, 2012) e a infecção por múltiplos tipos de HPV (MIRANDA *et al.*, 2013; WEELE *et al.*, 2016).

Outro fator importante na carcinogênese cervical é a integração do genoma viral. Esse evento é observado em infecções persistentes pelos HPVs de alto risco oncogênico, e é a chave principal para o desenvolvimento de lesões neoplásicas. Nele, ocorre a desregulação da expressão dos oncogenes virais *E6* e *E7*, levando à inativação de pontos de checagem críticos do ciclo celular e ao aumento da instabilidade genômica no hospedeiro (LOPES, 2014; NACHAJOVA *et al.*, 2015; MCBRIDE & WARBURTON, 2017; GROVES & COLEMAN, 2018). É um evento irreversível pondo um fim ao ciclo de vida viral gerando um ciclo produtivo incompleto, em que partículas virais não chegam a ser formadas (PINTO & QUEIROZ, 2013; MCBRIDE & WARBURTON, 2017).

A integração do genoma do HPV pode ocorrer em qualquer fase do processo infeccioso. Pode ser detectada tanto em lesões pré-malignas como em pacientes assintomáticos, mas a porcentagem de células contendo o DNA do HPV integrado aumenta à medida que as células progridem para o câncer invasivo (SHUKLA *et al.*, 2014). Acima de 90% dos carcinomas cervicais apresentam o genoma do HPV de alto risco integrado com o DNA celular (PINTO & QUEIROZ, 2013). É descrito na literatura que cerca de 100% dos cânceres causados pelo HPV18, 70% dos HPV16 e 81% dos HPV31 apresentam integração viral (CULLEN *et al.*, 1991; PIRAMI *et al.*, 1997).

A integração viral atua basicamente de 2 formas: i) pela linearização do genoma viral, onde a quebra do genoma frequentemente atinge as regiões *E1* e *E2* (ROSA *et al.*, 2009; PINTO & QUEIROZ, 2013; SCHMITZ *et al.*, 2012). ii) pela distribuição aleatória dos locais de integração do HPV por todo o genoma do hospedeiro, mas preferencialmente a locais frágeis comuns e regiões transcricionalmente ativas, onde pode haver ativação de genes oncogênicos e inativação de gene supressores de tumor (DOORBAR *et al.*, 2012; MCBRIDE & WARBURTON, 2017; WARBURTON *et al.*, 2018).

Assim, na integração pode haver a perda do controle inibidor da proteína E2 sobre os oncogenes *E6* e *E7*, levando a um aumento de produção dessas oncoproteínas virais o que resulta em transformação da célula hospedeira (WARBURTON *et al.*, 2018). O aumento do número de cópias do HPV integrado acarreta um aumento da quantidade das proteínas E6 e E7 disponíveis. A expressão elevada de E6 e E7, promove a instabilidade genômica levando à imortalização celular, por interromper a regulação do ciclo celular, ativar a telomerase, inibir a diferenciação celular, prevenir a apoptose, induzir a ocorrência de defeitos na duplicação cromossômica e na segregação durante a mitose (SCHMITZ *et al.*, 2012; PINTO & QUEIROZ, 2013; AKAGI *et al.*, 2014).

Pontos de ruptura de inserção também podem ocorrer dentro do gene *E1*, eliminando a função do gene *E2* à jusante, e as propriedades de supressão do crescimento da proteína E1 (WARBURTON *et al.*, 2018).

Ao avaliar a carga viral do HPV, vemos que seu papel no desenvolvimento das lesões cervicais ainda não está claro (DONG *et al.*, 2018). Sabe-se que a presença de alta carga viral de HPVs de alto risco oncogênico relaciona-se com maiores taxas de persistência da infecção, com a recorrência das lesões precursoras do câncer cervical, com o aumento da concentração das proteínas virais oncogênicas, com o aumento da probabilidade de integração do DNA viral. Todos esses fatores podem favorecer o agravamento das lesões (MÄNNIK *et al.*, 2002; KADAJA *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2008; NACHAJOVA *et al.*, 2015; WEELE, *et al.*, 2016).

Alguns estudos apontam a existência de associação de altas cargas virais com a severidade das lesões (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, *et al.* 2003; MA, *et al.*, 2012). Em outros estudos, a correlação entre a carga viral como um biomarcador para o câncer cervical não é encontrada (SHERMAN *et al.* 2003; CONSTANDINOU-WILLIAMS, *et al.*, 2010). Na literatura, existem autores que correlacionam a carga viral e o agravamento das lesões dependente ao tipo viral. Em um estudo realizado por Flores e colaboradores (2005) que avaliaram a carga viral dos tipos virais dos HPVs 16, 18, 31, 39, 45, 51, 52, e 58, observou-se que os tipos virais HPVs 16, 31, 52 e 58 apresentaram a maior carga viral. Além disso, que houve uma relação entre o aumento da carga viral do HPV e o risco da progressão das lesões. De forma semelhante, no estudo conduzido por Dong e colaboradores (2018) a carga viral dos HPVs 16, 31, 33, 52 e 58 foi correlacionada com a severidade das lesões cervicais,

em detrimento das cargas virais dos tipos virais de HPVs 18, 45, 56 e 59 onde não encontrou-se tal correlação.

2.7 - Epidemiologia do Câncer de colo do útero

Apesar do aumento no número de exames citopatológicos preventivos realizados e do grande avanço na implementação de novas estratégias de diagnóstico, o carcinoma cervical permanece, em nível mundial, entre as maiores causas de morte relacionadas ao câncer na população feminina (BERMUDEZ *et al.*, 2015; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2015). É o quarto câncer mais frequente em mulheres. Em 2018 foram estimados 570.000 novos casos, representando 6,6% de todas as neoplasias femininas (WHO, 2019c).

É um grande problema de saúde pública. Resultou em 2012, em aproximadamente 527.600 novos casos e 265.700 mortes em nível mundial (TORRE *et al.*, 2015). Em muitos países o câncer do colo do útero é o mais prevalente, principalmente em regiões da África Subsaariana, Sul da Ásia, América Latina, Caribe e Melanésia. A prevalência é menor em países da Ásia Ocidental, Austrália/Nova Zelândia e América do Norte (BRAY *et al.*, 2013; TORRE *et al.*, 2015). Aproximadamente 85% das mulheres que são diagnosticadas, e 88% das mulheres que morrem por este câncer vivem em regiões de baixos recursos econômicos (GINSBURG *et al.*, 2017).

Na América Latina e Caribe, de acordo com os dados da GLOBOCAN 2018, houve aproximadamente 56.000 novos casos de câncer cervical com 28.000 casos de mortalidade (IARC, 2019c). Segundo o INCA, esta neoplasia é a terceira mais frequente na população brasileira, sendo a quarta causa de morte entre as mulheres diagnosticadas por câncer, excetuando-se o câncer de pele não melanoma (INCA, 2019b). São estimados 16.370 novos casos de câncer cervical para o biênio de 2018-2019, e um risco estimado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo do útero é o primeiro mais incidente na Região Norte (25,62/100 mil); nas regiões Nordeste (20,47/100 mil) e Centro-Oeste (18,32/100 mil) ocupa a segunda posição. Já nas regiões Sul (14,07 /100 mil) e Sudeste (9,97/100 mil) este câncer ocupa a quarta posição (INCA, 2019b).

Este tumor é muito incomum em mulheres jovens abaixo dos 25 anos de idade. Entretanto, a partir desta faixa etária, a incidência do carcinoma cervical aumenta

progressivamente e atinge seu pico em mulheres acima dos 35 anos (LOWY & SCHILLER, 2006) (**Figura 7**).

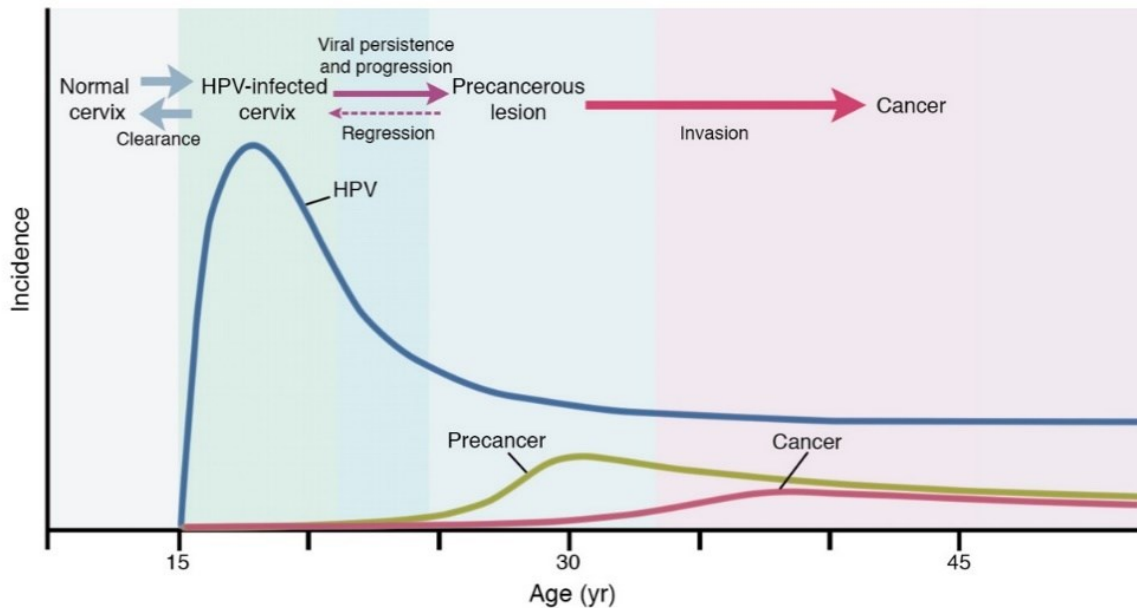


Figura 7 – Relação entre a incidência da infecção cervical pelo HPV e as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas. A incidência do HPV é demonstrada pela curva de linha azul. Seu pico relaciona-se com o início da vida sexual. A curva verde demonstra a incidência de lesões pré-neoplásicas. Há um intervalo, não fixo, entre o período de aquisição da infecção pelo HPV e o desenvolvimento destas lesões. Além disso, o gráfico demonstra que as lesões pré-neoplásicas possuem baixa incidência, já que apenas um subconjunto de mulheres infectadas progride para o seu desenvolvimento. Já a curva de incidência do câncer, representada pela linha rosa, reflete o longo intervalo entre as lesões pré-neoplásicas e progressão para o câncer invasivo. Quando as mulheres se aproximam dos 35 anos de idade, a incidência de câncer começa a aumentar. Fonte: LOWY & SCHILLER (2006).

2.8 - Prevenção da Neoplasia Intraepitelial Cervical e problemas em seu diagnóstico

Desde a introdução do esfregaço de Papanicolaou como o teste de rastreio para o seu diagnóstico há cerca de 50 anos, a incidência desta neoplasia diminuiu consideravelmente (RAMA *et al.*, 2006). O teste de Papanicolaou é um método eficaz para a detecção precoce do câncer do colo do útero, acessível e de simples execução (ARAÚJO *et al.*, 2011; ASHTARIAN *et al.*, 2017).

Em países desenvolvidos e nas regiões em que os programas de rastreio são operacionais, a taxa de mortalidade por câncer de colo está em evidente declínio, já que lesões pré-invasivas podem ser detectadas e tratadas adequadamente (BOSCH & MUÑOZ, 2002; DICKINSON *et al.*, 2012; SWANSON, 2013; TAINIO *et al.*, 2018).

Para ser uma estratégia bem-sucedida, é requerida para a realização do exame citológico de Papanicolaou. É dependente de fatores pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos. Necessita de profissionais bem treinados para que haja a coleta e o processamento do material de forma adequada, a interpretação padronizada dos achados citopatológicos e, principalmente, a existência de clínicos treinados para lidar com as anormalidades detectadas, com ênfase no acompanhamento e tratamento das lesões encontradas (DERCHAIN *et al.*, 2005; GRAVITT & JAMSHIDI, 2005; SWANSON, 2013).

Outra metodologia para o rastreamento de lesões pré-neoplásicas é a Citologia em Meio Líquido. É uma técnica alternativa ao teste de Papanicolaou em que há a obtenção final de um esfregaço em camada única de células, dispostas de maneira uniforme, a partir de uma suspensão de células. Essa técnica apresenta vantagens como interpretação mais rápida e menos exames insatisfatórios (INCA, 2011).

Na análise citológica, em caso de detecção de células atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas (ASC-US) ou de LSIL a recomendação do Ministério da Saúde brasileiro é repetir a Citologia em 6 meses. Caso a lesão persista, a paciente deve ser encaminhada à Colposcopia. Caso o resultado inicial seja de HSIL ou alguma alteração glandular, é indicado imediatamente o encaminhamento da paciente à colposcopia (IARC, 2019c).

O exame colposcópico é uma investigação complementar que analisa as características macroscópicas do epitélio cervical pela aplicação da solução salina, ácido acético diluído entre 3% e 5% e solução de Lugol (teste de Schiller), em passos sucessivos. A observação de áreas suspeitas ou irregulares na superfície cervical é indicativo de biópsia (IARC, 2019c).

No Brasil, pelas Diretrizes para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero 2016 do Ministério da Saúde, o exame citopatológico deve ser realizado em mulheres de 25 a 64 anos de idade, ou que já tiverem tido atividade sexual mesmo antes desta faixa etária. A periodicidade é a cada 3 anos, após 2 exames anuais consecutivos negativos (INCA, 2019c).

Existe um grande interesse na comunidade científica para a identificação de métodos e moléculas úteis na determinação da progressão das NICs, já que a base dos processos de triagem e diagnóstico, sofre da subjetividade intra e interobservador, além de outros fatores desde a coleta até os erros de detecção e interpretação. Estudos já demonstraram que a Citologia apresenta sensibilidade variando de 47 a

62%, e especificidade entre 60 a 95% para a detecção de NIC II e NIC III (MITCHELL *et al.*, 1998; NANDA *et al.*, 2000). Estima-se que 5 a 20% dos testes apresentem resultados falso-negativos na população em geral (ALLEN & HOLLADAY, 2002).

Dessa forma, apesar dos testes citológicos permitirem, de forma eficaz, a prevenção do câncer do colo do útero, este resultado está condicionado a uma cobertura de 80% da população alvo, à sua realização na periodicidade indicada pelo Ministério da Saúde e às condições técnicas de realização do teste que, caso não adequadas, podem prejudicar o rastreamento. Portanto, a introdução de biomarcadores para a verificação do risco de progressão de lesões precursoras à invasivas, com maior sensibilidade e especificidade algo de extrema importância. A Imuno-histoquímica tem sido considerada uma possível ferramenta na triagem do câncer do colo do útero ao auxiliar na identificação de mulheres com maior risco de progressão.

2.9 - Aplicação clínica de biomarcadores na Neoplasia Intraepitelial Cervical

Devido às razões já descritas, há grande a procura por biomarcadores úteis na determinação da progressão da Neoplasia Intraepitelial Cervical (KEATING *et al.*, 2001; GRAFLUND *et al.*, 2004; LOPES, 2014; PASCOAL-XAVIER, 2015). Entende-se como um biomarcador qualquer parâmetro biológico que possa ser mensurado e avaliado com precisão, capaz de indicar processos biológicos normais ou patogênicos e, até mesmo, ser úteis na avaliação farmacológica (STRIMBU & TAVEL, 2010). Dessa forma, na NIC, os biomarcadores devem ser sensíveis e específicos em relação às alterações neoplásicas celulares decorrentes da atuação das oncoproteínas.

Diversas estratégias têm sido utilizadas nesta busca e vários são as vias e os possíveis alvos, a citar: **i)** a regulação da expressão gênica via modulação por miRNAs (BEN *et al.*, 2015); **ii)** a sinalização celular, como, por exemplo, a atuação da proteína RAP1 (PASCOAL-XAVIER, 2015); **iii)** a proliferação celular, como a expressão do antígeno de proliferação Ki-67 (AHMED *et al.*, 2015); **iv)** o controle da duplicação do DNA, como as proteínas de Manutenção de Minicromossomos ou MCMs (DAS *et al.*, 2013); e ao **v)** controle da atividade do ciclo celular, como as proteínas regulatórias p16^{INK4a}, p53, p21, p27 (VAN DE PUTTE *et al.*, 2003; JIN & XU, 2015; LONGATTO FILHO *et al.* 2015; TAN & ANKATHIL *et al.* 2015).

Em relação aos miRNAs, os primeiros relatos aconteceram em 1993, através da observação que RNAs não codificantes participavam na regulação do ciclo de vida do nematódeo *Caenorhabditis elegans* (LEE *et al.*, 1993; WIGHTMAN *et al.*, 1993). Já os primeiros miRNAs de humanos foram descritos no início dos anos 2000, onde observou-se sua importância já que muitos foram conservados evolutivamente (LAGOS-QUINTANA *et al.*, 2001; LAU *et al.*, 2001; ESQUELA-KERSCHER & SLACK, 2006; STRACHAN & READ, 2013).

Como reguladores da expressão gênica os miRNAs estão envolvidos na regulação de vários processos celulares como o ciclo, proliferação, apoptose, diferenciação e desenvolvimento celular (SACHDEVA & MO, 2010). No câncer cervical, a expressão gênica diferenciada de alguns miRNAs é objeto de estudo. Por exemplo, a expressão gênica do miR-145 no câncer cervical, associa-se com a ocorrência de invasão e metástase (LIANG *et al.*, 2017) e a uma menor sobrevivência (AZIZMOHAMMADI *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2017). Além disso, sugere-se que o miR-145 é um potencial marcador tumoral específico para o HPV (LAJER *et al.*, 2012). O miR-218 também desempenha um papel fundamental na progressão desta neoplasia: sua superexpressão reduz a proliferação de células cancerígenas, induz a apoptose e inibe a migração celular (KOGO *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2016).

O biomarcador de proliferação celular, Ki-67 é estudado como ferramenta no diagnóstico e prognóstico de neoplasias. Ki-67 é uma proteína presente no núcleo das células em proliferação e é expresso nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular. Entretanto, a especificidade de Ki-67 em avaliar a proliferação celular é considerada baixa, já que em amostras cervicais, há uma expressão elevada dessa proteína na presença de inflamação (AGOFF *et al.*, 2003; PAN *et al.*, 2015).

Já as MCMs, proteínas de Manutenção de Minicromossomos, estão envolvidas na replicação do DNA celular. Elas desempenham papéis importantes na progressão do ciclo celular, atuam na iniciação e no licenciamento da replicação de DNA e, adicionalmente, representam o ponto de convergência de numerosas vias de sinalização envolvidas no crescimento celular (ROMANOWSKI & MADINE, 1996; DAS *et al.*, 2013). Na NIC é demonstrado que algumas MCMs apresentam elevada expressão de acordo com o avanço das lesões cervicais (FREEMAN *et al.*, 1999; DAS *et al.*, 2013). É também descrito que a expressão de MCM2 se correlaciona positivamente com os tipos de HPV de alto risco (ZHENG, 2015).

Dentre as proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, está um importante biomarcador, a proteína supressora de tumor denominada p16^{INK4a}. Esta proteína, produto do gene *CDKN2A*, em ação conjunta com p53, controla negativamente a progressão do ciclo de divisão celular da fase G1 para a S. É uma das várias proteínas envolvidas neste ponto de checagem. p16^{INK4a} atua inibindo as quinases dependentes de ciclina como a CDK4 e a CDK6, impedindo a progressão do ciclo. Na infecção pelo HPV, a p16^{INK4a} é encontrada hiperexpressa. Acredita-se que este fenômeno seja consequência da liberação do fator de transcrição E2F promovida pela redução da proteína pRb devido a ação de E7. A metilação do gene *CDKN2A* é outro fenômeno epigenético também encontrado. Na população de células tumorais de lesões cervicais escamosas precursoras ou invasoras, este fenômeno ocorre numa frequência que varia de 10 a 100%. A perda da transcrição do gene *CDKN2A*, anula o mecanismo de controle negativo da proteína p16, favorecendo a progressão de células com DNA danificado e contribuindo para o descontrole na proliferação celular (ELEUTÉRIO JUNIOR *et al.*, 2006; LONGATTO FILHO *et al.* 2015).

Vários estudos apontam a expressão de p16 como sendo um bom biomarcador e incentivam seu emprego na triagem das Lesões Escamosas Intra-epiteliais de alto grau e na identificação de células infectadas pelo HPV (EKALAKSANANAN *et al.*, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2006; TOSUN *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2015). De fato, p16^{INK4a} é uma das proteínas mais utilizadas para a avaliação de progressão de lesões cervicais, tanto em amostras citológicas como em amostras de tecido cervical. Entretanto, algumas limitações ao seu uso foram demonstradas, o que impede sua utilização na prática clínica. Entre elas estão: i) a falta de padronização dos ensaios Imuno-histoquímicos, o que reduz a reprodutibilidade do método, e ii) a dificuldade de interpretação de cortes histopatológicos, o que pode gerar resultados falsos positivos (TSOUMPOU *et al.*, 2009; NUOVO, 2016).

2.10 - Proteína RAP1

Na busca por biomarcadores de progressão de lesões cervicais, o estudo de Pascoal-Xavier e colaboradores (2015) apresenta a proteína RAP1, uma pequena GTPase da superfamília RAS, como candidata.

A superfamília RAS de pequenas GTPases compreende mais de 150 proteínas. Essa superfamília é subdividida em famílias e subfamílias com base na estrutura,

sequência de aminoácidos e função das proteínas (WENNERBERG *et al.*, 2005; GOITRE *et al.*, 2014). A superfamília RAS recebeu destaque por seu papel na regulação de múltiplos eventos-chaves no processo de carcinogênese e progressão neoplásica (WENNERBERG *et al.*, 2005; BAILEY *et al.*, 2009).

A proteína RAP1 foi inicialmente identificada como proteína Krev-1, produto do gene *K-rev*, possuindo atividade antioncogênica capaz de reverter o fenótipo maligno de fibroblastos transformados por K-RAS, proteína codificada por um dos genes mutados de RAS (KITAYAMA *et al.*, 1989). Em mamíferos, ocorre a expressão de duas isoformas da proteína RAP1: a RAP1A e a RAP1B, e de três isoformas da proteína RAP2: a RAP2A, a RAP2B e a RAP2C. As proteínas RAP2 são 60% homólogas às proteínas RAP1 (GLOERICH & BOS, 2011).

As isoformas de RAP1, RAP1A e RAP1B, apresentam 95% de homologia entre si, e são produtos de dois genes diferentes localizados nos cromossomos 1 e 12, respectivamente (MITRA *et al.*, 2003). Em mamíferos, as proteínas RAP1A e RAP1B podem atuar de forma divergente, dependendo de sua localização tecidual e celular (CHEN *et al.*, 2013). É descrito na literatura, que a RAP1A se localiza constitutivamente em múltiplos compartimentos. Está presente em grânulos específicos de neutrófilos, em grânulos secretores de glândulas pancreática e salivar, na membrana plasmática, no complexo perinuclear de Golgi, no retículo endoplasmático e no envelope nuclear (MITRA *et al.*, 2003; BIVONA *et al.*, 2004; GLOERICH & BOS, 2011). Entretanto a RAP1B localiza-se nas membranas celulares, e é predominantemente encontrada nas plaquetas (BERGER *et al.*, 1994; TORTI & LAPETINA, 1994; GUIDETTI & TORTI, 2012).

Nos carcinomas de células escamosas, RAP1 tem sido encontrada altamente expressa. Sua forma ativa ligada ao GTP (guanina trifosfato) localiza-se no núcleo, enquanto a forma inativa ligada ao GDP (guanina difosfato) localiza-se no citoplasma, numa distribuição perinuclear (MITRA *et al.*, 2003; FARINA *et al.*, 2004; PASCOAL-XAVIER, 2011).

A proteína RAP1, assim como as demais GTPases, agem como interruptores moleculares em diversas vias de sinalização intracelulares (GLOERICH & BOS, 2011). Esse mecanismo de ativação e inativação de RAP1 é regulado por fatores de troca de nucleotídeos de guanina, também chamados GEFs (sigla inglesa para *Guanine Nucleotide Exchange Factors*) e por proteínas ativadoras de GTPase,

chamados de GAPs (sigla inglesa para *GTPase Activating Protein*) (BAILEY *et al.*, 2009) (Figura 8).

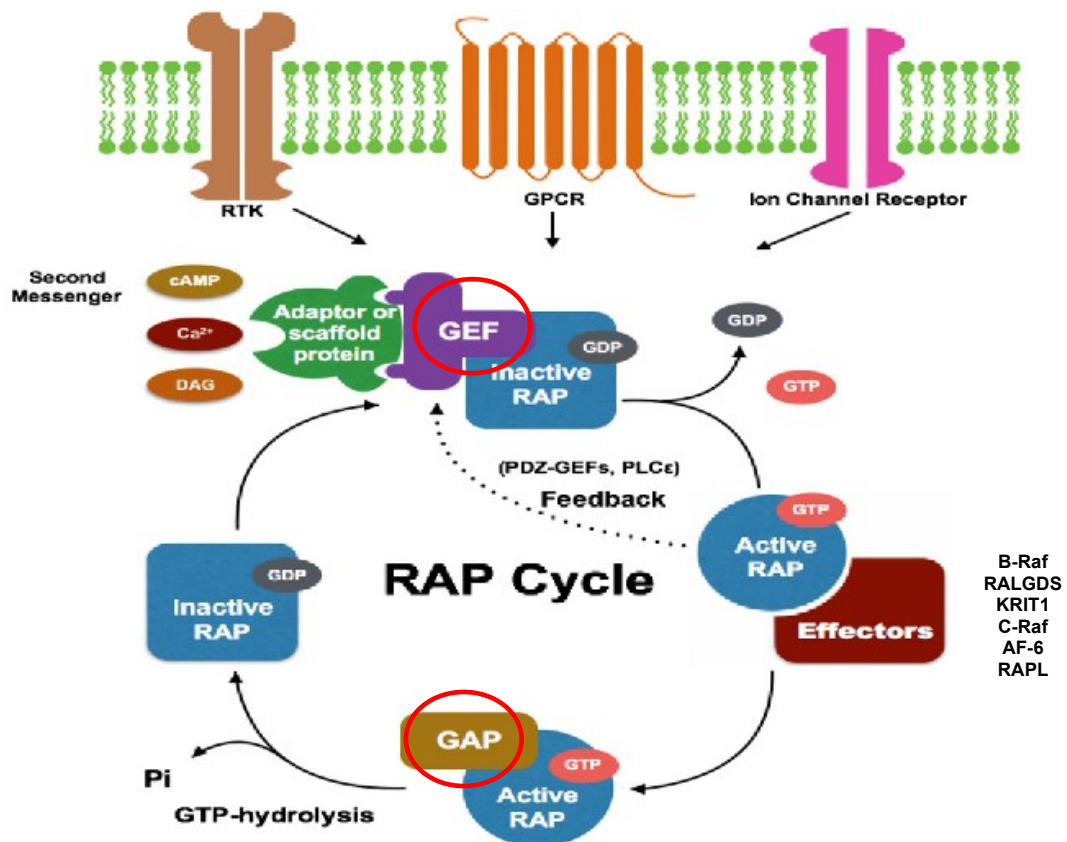


Figura 8- Controle da atividade da proteína RAP1 GTPase via GEFs e GAPs. A RAP1 pode ser ativada por ação de vários receptores: 1) acoplados à tirosina quinases (RTKs), 2) receptores acoplados à proteína G (GPCR) e 3) canais de íons (ICR). A sinalização da RAP é controlada por proteínas ativadoras (GEFs) e inibidoras (GAPs). Além desse controle, há vias que regulam a atividade da RAP através de diversas proteínas correguladoras e efetoras. Como efetoras podemos citar as proteínas B-Raf, C-Raf, AF-6, RAPL. Além disso, o RAP-GTP interage com proteínas ativadoras e efetoras PDZ-GEFs ou PLCε, respectivamente, para fornecer feedback positivo à ativação local da RAP. Fonte: Guo *et al.*, 2016.

Os GEFs medeiam a dissociação do GDP à proteína RAP1, o que permite que o GTP se ligue, ativando-a. Por outro lado, a inativação de RAP1 ocorre pela ação das GAPs, que aumentam a atividade intrínseca da GTPase, induzindo a hidrólise de GTP ao GDP (GLOERICH & BOS, 2011). Como a concentração intracelular de GTP livre excede ao GDP, os GEFs atuam acelerando a dissociação do GDP, o que aumenta a porcentagem de GTP ligado à RAP1. A via de sinalização termina quando o RAP-GTP, forma ativa, é hidrolisado em RAP-GDP, forma inativa (ZHANG *et al.*, 2017; JAŚKIEWICZ *et al.*, 2018).

Existem diferentes GEFs atuando no controle da atividade de RAP1. Há evidências de pelo menos sete classes distintas desses fatores: C3G, PDZ-GEF,

Epac, Repac, CD-GEFIII, CD-GEFI e DOCK4. Muitos desses GEFs não são exclusivos no controle da atividade de RAP1, mas também podem atuar em outras GTPases. O mesmo é observado para as GAPs, tais como, RAPGAP, Spa1 e Spa-L1, E6-TP1 (FRISCHE & ZWARTKRUIS, 2010; JAŚKIEWICZ *et al.*, 2018).

Além das proteínas ativadoras (GEFs) e inibidoras (GAPs) é descrito na literatura, proteínas que são efetoras e correguladoras de RAP1 (**Figura 8**). Como proteínas correguladoras podemos citar aquelas que regulam as GEFs e GAPs, tais como as proteínas quinases e a alfa proteína G, respectivamente. Em relação às proteínas efetoras, muitas são descritas tais como RapL, Riam, AF-6, dentre outras (GUO *et al.*, 2016).

A ativação de Epac1 desencadeia a sua realocação para a membrana plasmática, ativando a RAP1 localizado na membrana e melhorando a adesão celular mediada por Integrinas. Essa sinalização é regulada diretamente pelo mensageiro secundário cAMP (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico), que controla a sinalização local do complexo Epac-Rap1 através de sua distribuição celular (ZHANG *et al.*, 2017). Além de cAMP, na literatura já foram identificados pelo menos dois mensageiros secundários diferentes ativadores de RAP1, íon cálcio (Ca^{2+}) e diacilglicerol (DAG) (GUO *et al.*, 2016) (**Figura 8**).

A proteína RAP1 também pode ser ativada por fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas em várias receptores acoplados à tirosina quinases (RTKs, sigla inglesa para *Receptor Tyrosin Kinases*) ou em receptores acoplados à proteína G (GPCR, sigla inglesa para *G-Protein-Coupled Receptors*) (CHEN *et al.*, 2013; JAŚKIEWICZ *et al.*, 2018; SHAH *et al.*, 2019). Por não haver um receptor comum para todos os tipos de células, cuja estimulação levaria à ativação de RAP1, sua ativação e, conseqüentemente, seu efeito, está intrinsecamente dependente ao tipo celular (GUO *et al.*, 2016; JAŚKIEWICZ *et al.*, 2018) (**Figura 8**).

RAP1 desempenha importantes funções na biologia celular, atuando como transdutor bioquímico nas vias de sinalização celular (GUO *et al.*, 2016; JAŚKIEWICZ *et al.*, 2018). Possui relevante papel nas funções celulares mediadas por integrinas. Dessa forma, promove: **(i)** ativação e angiogênese via receptor do Fator de Crescimento Vascular Endotelial 2 (VEGFR2, sigla inglesa para *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*), **(ii)** participa na formação de sinapses imunológicas, na fagocitose mediada por macrófagos, na adesão induzida por quimiocinas e transmigração de leucócitos e células dendríticas para órgãos periféricos, **(iii)** participa

também na adesão e agregação plaquetárias, bem como na adesão de células a várias proteínas da matriz extracelular, como fibronectina, fibrinogênio, colágeno e a laminina (CAREY & STORK, 2002; BOS, 2005; BOETTNER & AELST, 2009; LAKSHMIKANTHAN *et al.*, 2011; SHAH *et al.*, 2019).

Além disso, a ativação de RAP1 promove a formação de contatos célula-célula mediados por caderinas (ZHANG *et al.*, 2017), atuando na formação de junções celulares (KOOISTRA *et al.*, 2007; PANNEKOEK *et al.*, 2009), no controle do estabelecimento da polaridade celular (ITOH *et al.*, 2007), na migração (SAWANT *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2017), proliferação (BANERJEE *et al.*, 2011) e exocitose celular (BRANHAM *et al.*, 2009).

Além dessas funções descritas, alguns estudos avaliam o papel de RAP1 em processos inflamatórios. Pode atuar, quando ativada, no aumento da expressão de citocinas (YOSHIDA *et al.*, 2014; CAI *et al.*, 2015) ou na modulação de NF- κ B (Fator Nuclear *kappa* B) (CAI *et al.*, 2015; POON *et al.*, 2015). Até o presente estudo, a associação e atuação de RAP1 com a inflamação do colo uterino ainda não foi esclarecida.

2.11- Expressão de RAP1 em tumores

Além de controlar os todos os processos fisiológicos citados acima, RAP1 desempenha um papel ativo nos processos patológicos neoplásicos (BAILEY *et al.*, 2009; MAERTENS & CICHOWSKI, 2014). É descrito na literatura que a expressão desregulada de RAP1 foi observada: **(i)** em várias linhagens celulares como em células escamosas de cavidade oral (CHEN *et al.*, 2013), células epiteliais da mama (ITOH *et al.*, 2007), em leucemias (MINATO, 2013), **(ii)** em neoplasias como o melanoma (GAO *et al.*, 2006), do pâncreas (ZHANG *et al.* 2006), da próstata (BAILEY *et al.*, 2009), da tireoide (VAN STAVEREN *et al.*, 2012) e do cólon-retal (GAO *et al.*, 2018).

É provável, que as ações fisiológicas de RAP1 estejam envolvidas em eventos iniciais da transformação neoplásica como na inibição à apoptose e nas alterações do metabolismo celular e também nos processos mais tardios como a migração, invasão e metástase (**Figura 9**) (SHAH *et al.*, 2019). Já é descrito na literatura, que os eventos de migração celular e metástase tumoral são responsáveis por causar até 90% da mortalidade associada ao câncer, sendo, por isso, a compreensão da atuação de

RAP1 na carcinogênese algo de grande importância. Além desses eventos, há também a perda de polaridade epitelial e consequentes rupturas na arquitetura dos tecidos, características de várias neoplasias malignas (ZHANG, *et al.*, 2017; JAŚKIEWICZ *et al.*, 2018).

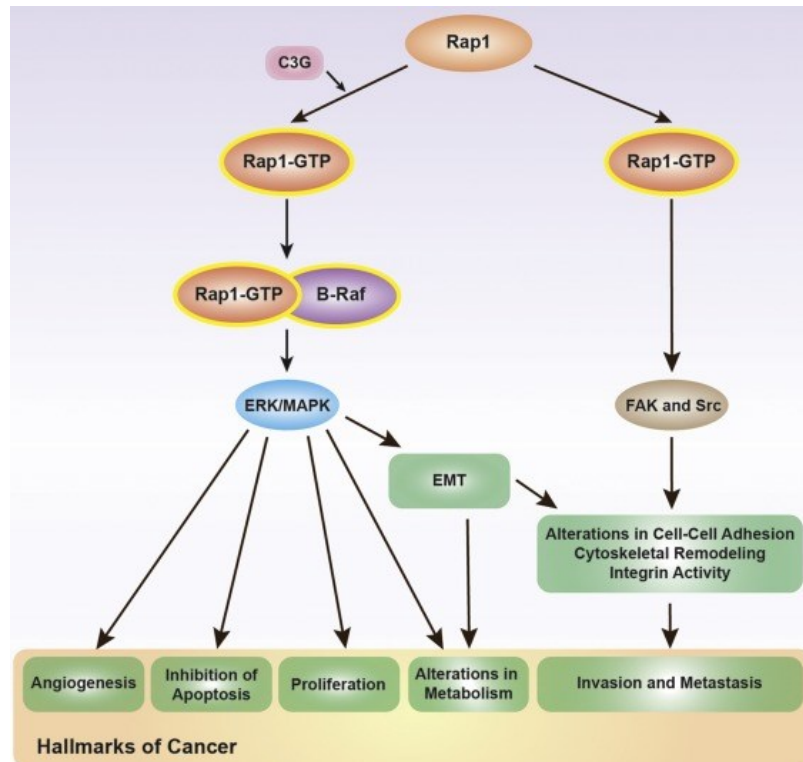


Figura 9- Atuação da proteína RAP1 em neoplasias. RAP1 está envolvida em várias atividades no desenvolvimento neoplásico. Atua na angiogênese, proliferação, alteração do metabolismo, invasão, metástase e inibição da apoptose. Fonte: SHAH *et al.*, 2019.

Alguns estudos demonstram que a ativação aberrante de RAP1 leva ao aumento da proliferação celular e carcinogênese. No carcinoma espinocelular da cavidade oral, a elevada expressão de RAP1A exibiu correlação positiva com progressão tumoral, metástase e sobrevida (CHEN *et al.*, 2013). No câncer de mama, o aumento da ativação de RAP1 induziu a formação de tumores e a progressão para malignidade (ITOH *et al.*, 2007).

Acredita-se que ativação aberrante de RAP1 seja desencadeada por intermédio da ação de seus reguladores (GEFs e GAPs), já que a presença de mutações em RAP1 é raramente observada (YAJNIK *et al.*, 2003; GYAN *et al.*, 2005; ITOH *et al.*, 2007; FRISCHE & ZWARTKRUIS, 2010).

Alguns estudos apontam que o aumento da atividade de RAP1 está relacionado à deleção ou mutação dos genes que codificam as proteínas inibidoras da ação de RAP1, como RAP1GAP e SPA1 (BAILEY *et al.*, 2009; GAO *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2006). RAP1GAP atua como supressora de tumor e exibe expressão diminuída em vários tipos de câncer. Na pesquisa realizada por Gao e colaboradores (2018), a diminuição da expressão de RAP1GAP foi associada com a progressão do tumor e o mau prognóstico do câncer cólon-retal. No câncer pancreático, a perda da função de RAP1GAP favoreceu o crescimento, a sobrevivência e a invasão das células neoplásicas *in vitro* e *in vivo* (ZHANG *et al.*, 2006). Além disso, a perda da expressão de RAP1GAP promoveu a migração e invasão de células no câncer de próstata (BAILEY *et al.*, 2009).

Entretanto, no estudo de MITRA e colaboradores (2008), a superexpressão de RAP1GAP favoreceu positivamente a invasão, ao regular a ação das metaloproteases 2 e 9 no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, demonstrando que os contextos específicos do tipo de célula são potencialmente importantes.

No carcinoma de células escamosas é descrito uma tendência da translocação da proteína RAP1-GTP para o núcleo, enquanto a RAP1-GDP é retida no citoplasma. Essa translocação nuclear pode indicar a atuação ativa de RAP1 no processo neoplásico (MITRA *et al.*, 2003; PASCOAL-XAVIER *et al.*, 2015).

O envolvimento de RAP1 e seus reguladores tem sido investigado em diversos tipos de câncer, entretanto, apenas um estudo foi direcionado à análise da expressão tecidual de RAP1 no contexto da patogênese do câncer cervical (PASCOAL-XAVIER *et al.*, 2015).

Neste estudo, avaliou-se por meio da técnica de Imuno-histoquímica ou Imuno-marcação de RAP1, a sua associação com a progressão de lesões neoplásicas cervicais. Para isso, estudou-se 183 amostras cervicais, sendo 84 classificadas como NIC I, 66 NIC II/ III e 33 negativas para lesões Intraepiteliais e pela infecção ao HPV. Observou-se um aumento gradual da expressão de RAP1 das amostras controles em direção à NIC II/III. Destaca-se que nesse estudo, a expressão de RAP1 foi comparada à expressão de p16^{INK4a}. Foi também observada uma boa correlação na expressão de ambos os marcadores nas amostras cervicais analisadas.

Considerando a importância de RAP1 como proteína envolvida em importantes vias de sinalização celular intrinsecamente associadas a processos de adesão, migração celular, proliferação e angiogênese, justifica-se a relevância de estudos

direcionados à avaliação de RAP1 em amostras cervicais de pacientes portadoras de Neoplasias Cervicais e Câncer, além de indivíduos controle, com o objetivo de comparar os achados observados em estudos anteriores relacionados à patogênese do câncer cervical (PASCOAL-XAVIER, 2015) e da cavidade oral (CHEN *et al.*, 2013), que acometem sítios equivalentes da arquitetura tecidual (epitélios estratificados escamosos) e fortemente associados à infecção pelo HPV.

3 - RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O exame preventivo Papanicolaou é a principal estratégia utilizada em programas de rastreamento para o controle do câncer do colo do útero em todo o mundo. Este exame quando implantado adequadamente, opera com grande impacto na redução da incidência e mortalidade do câncer cervical. Possibilita uma redução de cerca de 80% da mortalidade por esta neoplasia quando aliado juntamente com tratamento adequado das lesões precursoras (ARCARO *et al.*, 2010; DENNY & PRENDIVILLE, 2015).

Apesar do aumento no número de exames de Papanicolaou realizados e do grande avanço na implementação de novas estratégias de diagnóstico, como os testes moleculares, o carcinoma cervical permanece entre as maiores causas de morte relacionadas ao câncer na população feminina em todo o mundo. Estudos experimentais e epidemiológicos apontam a infecção persistente por HPV de alto risco como o principal fator carcinogênico.

No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda exames citopatológicos periódicos anuais e, após dois resultados negativos consecutivos, exames trienais como estratégia de rastreamento. Entretanto, apesar da alta especificidade (98%), o exame de Papanicolaou, apresenta baixa sensibilidade (51%). A porcentagem de resultados falso negativos na citologia convencional pode variar 5% a 70%, e os falso-positivos, de 10% a 30% na dependência da subjetividade intra e interobservador, além de outros fatores desde a coleta até os erros de detecção e interpretação (CORTE *et al.*, 2007). Até mesmo o método histopatológico, considerado o método mais confiável para o diagnóstico definitivo das lesões cervicais, também é afetado por certa taxa de variação interobservador (ISMAIL *et al.*, 1989).

Devido às limitações dos testes utilizados no rastreio e diagnóstico das lesões cervicais, a pesquisa de novos biomarcadores torna-se primordial. É grande a busca por marcadores celulares sensíveis e específicos, que possam identificar alterações e transformações celulares relacionadas e/ou decorrentes da infecção produtiva pelo HPV, e ainda, na identificação de lesões com maior risco de progressão maligna.

Dessa forma, vários marcadores celulares detectados por Imuno-histoquímica têm sido estudados. A avaliação da sensibilidade, especificidade e capacidade de detecção de células neoplásicas destes biomarcadores tanto em biópsias quanto em esfregaços cervicais, também tem sido avaliada.

Dentre esses possíveis biomarcadores está a proteína RAP1, uma pequena GTPase da superfamília RAS. Esta proteína, assim como as demais GTPases, agem como interruptores moleculares em diferentes vias de sinalização intracelulares e sua atuação tem sido estudada em diferentes processos patológicos neoplásicos. Destacam-se estudos direcionados à avaliação da expressão de RAP1 e de moléculas relacionadas em leucemias e tumores de pâncreas, próstata, tireoide e cólon-retal (ZHANG *et al.* 2006; ITOH *et al.*, 2007; BAILEY *et al.*, 2009; van STAVEREN *et al.*, 2012; MINATO, 2013; GAO *et al.*, 2018).

Vários estudos relatam o envolvimento de RAP1 em diferentes vias de sinalização celular, estando intrinsecamente associada a processos de adesão, migração, proliferação celular e angiogênese (SHAH *et al.*, 2019). Estes achados demonstram ser esta proteína muito importante no processo de agravamento e disseminação de lesões, o que fundamenta seu estudo em neoplasias.

A escassez de informações sobre a ação de RAP1 como biomarcador Imuno-histoquímico de progressão e infecção por HPV em lesões neoplásicas do colo do útero, também justifica este estudo.

4 - OBJETIVOS

Avaliar a expressão da proteína RAP1 em Lesões Escamosas Intraepiteliais Cervicais por meio da técnica de Imuno-histoquímica e correlacioná-la com o grau de lesão.

4.1- Objetivos específicos

- Classificação das lesões;
- Investigar a presença do DNA-HPV em amostras de biópsias cervicais pela técnica de *Nested-PCR*;
- Determinar o tipo viral infectante de HPV, por Sequenciamento Automático do amplicon de 150 pb do gene *L1* pela técnica de Sanger;
- Avaliar a expressão de RAP1 em distintas amostras cervicais classificadas histologicamente em: Cervicite, Cervicite com Alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV, NIC I, NIC II, NIC III e Carcinoma de Células Escamosas (CCE), por meio da técnica de imuno-histoquímica;
- Correlacionar a expressão de RAP1 ao grau da lesão.

5 – METODOLOGIA

5.1 - População estudada e aspectos éticos

Nesse estudo, foram analisadas 101 amostras cervicais obtidas por biópsias de colo do útero. Seus espécimes correspondentes encontravam-se incluídos em parafina. Todas as amostras foram selecionadas no banco de amostras do Laboratório da Anatomia Patológica do Hospital Luxemburgo (Belo Horizonte - MG) e gentilmente cedidas pelo Dr. Paulo Guilherme de Oliveira Salles, responsável técnico pelo referido laboratório. Essas amostras, categorizadas no **Tabela 1**, foram separadas em grupos de acordo com a análise histopatológica.

Tabela 1 – Grupos de pacientes selecionados para o estudo

Diagnóstico Histopatológico	N amostral
CE - Cervicite crônica inespecífica	13
CEH - Cervicite com Alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV	06
NIC I - Neoplasia Intraepitelial de grau I	25
NIC II - Neoplasia Intraepitelial grau II	17
NIC III - Neoplasia Intraepitelial grau III	20
CCE – Carcinoma de Células Escamosas	20
Total	101

Foram incluídas apenas mulheres com idade acima de 18 anos, sendo seus dados clínico-epidemiológicos restritos, consistindo apenas do diagnóstico laboratorial da lesão. A difícil localização de todas as pacientes envolvidas no estudo impossibilitou o emprego do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o que restringiu o acesso às informações clínico-epidemiológicas.

A prática da coleta histológica foi realizada sob visão colposcópica identificada por médicos ginecologistas em exames histológicos de rotina, no período de 2016 a 2017.

Destaca-se que tais amostras foram concedidas na forma de empréstimo durante o período de realização da pesquisa, ficando os blocos de parafina sob a guarda

provisória dos Laboratórios envolvidos na pesquisa, localizados no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia (FAFAR) – UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais), e no Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - UFMG. Após esse período, todo o material foi devolvido ao Laboratório de origem no Hospital Luxemburgo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, número 2.533.704 e emenda, e pelo CEP do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Luxemburgo registrado com o número 2.662.189 (**Anexo A, B e C**).

5.2 - Análise Histopatológica

Primeiramente, todas as amostras selecionadas foram analisadas por médicos patologistas de reconhecida competência, no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Luxemburgo para emissão de laudos histopatológicos. Posteriormente, estas mesmas amostras foram reexaminadas no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina (FM) da UFMG, pelo Dr. Marcelo Pascoal Xavier, docente do Departamento de Anatomia Patológica desta faculdade.

As lâminas de tecido cervical obtidas de pacientes diagnosticadas com Câncer cervical foram também encaminhadas ao Laboratório de Anatomia Patológica Tafuri (Belo Horizonte, MG), sob a coordenação do Dr. Alexandre Tafuri, para definição do grau de diferenciação dos carcinomas (**Tabela 2**). Esse parâmetro foi definido por quatro Médicos Patologistas de reconhecida competência.

Tabela 2 – Classificação do grau de diferenciação das amostras de Câncer de Células Escamosas

Diagnóstico Histopatológico	N amostral
CCEP- Carcinoma de Células Escamosas Pouco diferenciado (grau III)	8
CCEM- Carcinoma de Células Escamosas Moderadamente diferenciado (grau II)	12
Total	20

Todas as lesões foram classificadas de acordo com critérios descritos estabelecidos na literatura médica (WAXMAN *et al.*, 2012). Os graus de diferenciação

dos carcinomas foram definidos com bases nos critérios definidos pela FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*).

Para a análise histopatológica, foram realizados cortes das amostras incluídas em parafina e fixadas em formalina (FFPE, sigla inglesa para *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded tissues*), na espessura de 5 µm no micrótomo 60 (MICROM, modelo HM315R) e, posteriormente, corados por HE (hematoxilina e eosina).

5.3 - Análise molecular

5.3.1 - Extração de ácidos nucleicos

Para obter-se o DNA das amostras FFPE foram realizados cinco cortes de 10 µm de cada amostra, e colocados em tubos eppendorffs de 1,5 mL, identificados e previamente autoclavados para eliminação de interferentes. O micrótomo 60 (MICROM, modelo HM315R) e a navalha foram cuidadosamente limpos com xilol, etanol e solução de Hipoclorito de Sódio a 2,5%, nesta ordem, entre a coleta de amostras distintas para prevenir a contaminação cruzada (WRIGHT & MANOS, 1990).

Para a desparafinização das amostras, os cortes foram submetidos à lavagens em 1 mL xilol, aquecido a 65°C, sob rotação em Homogeneizador (PROENIX®, modelo AP 22), por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas em centrífuga B. BRAUN SIGMA® (modelo 2K15), a 3.000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante após a centrifugação e repetiu-se o processo por mais duas vezes.

Para o processo de rehidratação, as amostras foram lavadas com concentrações descendentes de etanol. Primeiramente, adicionou-se 1 mL de álcool etílico absoluto, com consecutiva centrifugação em centrífuga B. BRAUN SIGMA® (modelo 2K15), a 10.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e o processo descrito foi repetido mais uma vez. Este procedimento foi repetido realizando-se lavagens com álcool etílico a 95% e álcool etílico a 70%; porém em ambas foram realizadas somente uma lavagem.

A realização das etapas de lise celular e digestão enzimática de proteínas foi conduzida segundo o protocolo de extração descrito por Wright & Manos (1990), com algumas modificações realizadas pelo Laboratório de Patogênese Molecular do Departamento de Morfologia, do ICB- UFMG. A partir do material hidratado, a lise do tecido iniciou-se. Para tal finalidade, foi adicionado um volume de 500 µL de solução

de digestão contendo 50 mM de Tris-HCl - pH 8,5 (Promega), 1 mM de EDTA (Gibco), 0,5% de Tween 20 (Invitrogen) e 1 µg/µL de proteinase K (solução 10 mg/mL), seguida pela incubação em banho-maria (FANEM®, modelo 32683) a 56 °C por, no máximo, 5 dias. A proteinase K é uma enzima amplamente utilizada na digestão de proteínas, e é essencial para a solubilização completa do tecido. Os períodos de digestão podem variar de 3 a 5 dias até que os tecidos estejam totalmente digeridos (MASUDA *et al.*, 1999; SENGÜVEN *et al.*, 2014). Após a digestão completa do tecido, os tubos com as amostras foram incubados a 95°C em à seco (VHD, modelo B2-AQ), durante 1 hora, para inativação completa da proteinase K e outras proteínas. Assim, obteve-se o DNA das amostras cervicais na forma de “lisado” (LOBATO, 2011). As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante proveniente do lisado, foi transferido para outro tubo eppendorff para ser utilizado na PCR. Tal método de extração, em um trabalho anterior realizado em nosso grupo de pesquisa, no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FAFAR – UFMG, demonstrou ser mais efetivo do que o DNA purificado nas análises subsequentes por PCR. Por essa razão, escolheu-se o mesmo método de extração para a realização do presente estudo.

5.3.2 - Amplificação do gene de β -globina e identificação da infecção por HPV

A partir do lisado obtido foram utilizados os subsequentes métodos moleculares, já padronizados no Laboratório de Patogênese Molecular do Departamento de Morfologia do ICB – UFMG, e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FAFAR - UFMG.

Embora tecidos e proteínas estejam bem preservados em FFPE, esse tipo de material é pobre para aplicações em Biologia Molecular. Os ácidos nucleicos são degradados e modificados quimicamente, sendo sua extração um grande desafio (MASUDA *et al.*, 1999; VON AHLFEN *et al.* 2007).

A formalina é o fixador mais amplamente utilizado, por ser capaz de preservar os tecidos e seus componentes para armazenamento em longo prazo (SRINIVASAN *et al.*, 2002). No processo de fixação por formalina, ocorrem ligações cruzadas dos ácidos nucleicos à outros constituintes celulares (VON AHLFEN *et al.*, 2007; PATEL *et al.*, 2016; SEILER *et al.*, 2016). Além disso, a formalina é oxidada em ácido fórmico,

o que causa a depurinação e a quebra da dupla fita de DNA (DIETRICH *et al.*, 2013). Há também algumas influências processuais e ambientais que impactam a extensão da fragmentação dos ácidos nucleicos, tais como o pH do fixador e a temperatura elevada de armazenamento, respectivamente (SRINIVASAN *et al.*, 2002; GILBERT *et al.* 2007; KOCJAN *et al.*, 2012).

Devido à fragmentação dos genomas humano e viral que ocorre no processamento das amostras de tecido, recomenda-se a amplificação por PCR de alvos relativamente pequenos (KOCJAN *et al.*, 2012; HARLÉ *et al.*, 2018). Por este motivo, foram utilizados oligonucleotídeos capazes de amplificar fragmentos menores dos genomas humano e viral. Visando aumentar a sensibilidade e a especificidade da técnica de PCR, utilizou-se como metodologia protocolos do tipo *Nested-PCR* e *Hemi-nested-PCR*. Nessas metodologias há amplificação inicial de um segmento genômico com um conjunto diferente de primers, sendo que esse produto amplificado é utilizado como fonte de DNA para uma segunda reação de PCR. Assim, a *Nested-PCR* amplifica sequências localizadas internamente ao segmento amplificado na primeira reação. Quando se utiliza na segunda reação somente um primer diferente ao da primeira reação, a reação é denominada de *Hemi-nested-PCR* (RAHMAN *et al.*, 2013). As técnicas de *Nested-PCR* e *Hemi-nested-PCR* provaram ser mais sensíveis para a detecção do DNA do HPV, do que os métodos de PCR baseados em apenas uma reação de amplificação (PELT-VERKUIL *et al.*, 2008).

A análise molecular foi realizada a partir de uma alíquota retirada do lisado obtido de cada amostra de tecido. Para a verificação da integridade do DNA extraído de cada amostra, foi realizada a amplificação do gene de β -globina humano. Posteriormente foram realizadas a pesquisa do DNA de HPV, e a genotipagem dos HPVs por Sequenciamento Automático de DNA.

As reações de PCR foram iniciadas com uma alíquota de 2 μ L do lisado extraído. Caso a amplificação fosse negativa, a quantidade de DNA seria ajustada, sendo testados volumes de 1 e 3 μ L da amostra original não diluída, e 3 μ L de uma diluição a 1:10.

A amplificação ocorreu em Termocicladores Automáticos (Applied Biosystems®, modelo 2720). As etapas de Extração e Armazenamento do DNA, preparo da solução (Mix) com os reagentes da reação de PCR, adição do DNA à mistura da reação de PCR e Eletroforese, foram realizadas em ambientes diferentes para evitar contaminação. Em todas as reações de PCR foram incluídos controles

positivos (amostras sabidamente positivas obtidas no próprio Laboratório por testes aleatórios) e negativo (branco da reação), tubo que continha todos os reagentes da PCR, exceto o DNA. Os produtos da PCR, juntamente com o Padrão de peso molecular, foram submetidos à Eletroforese em gel de poliacrilamida à 6%.

A corrida eletroforética foi realizada com 5 µL do produto de PCR acrescidos de 5 µL de tampão de amostra 2X (composto por Azul de bromofenol a 0,25%; Xilenocianol a 0,25%; Ficoll 400 a 15% em tampão 5X Tris-Borato-EDTA – TBE), aplicados em canaletas distintas no gel de poliacrilamida 6% em tampão TBE 1X, a uma voltagem de 75V (Volts) por 5 minutos e, em seguida, aplicada a voltagem de 135V, por cerca de 40 minutos.

Após a corrida, o gel de poliacrilamida foi corado com Nitrato de Prata. Para isso, primeiramente o gel foi submerso em 50mL de solução fixadora (contendo 1 mL de Ácido Acético, 4 mL de etanol 95% e 45 mL de água destilada) por 10 minutos. Após essa etapa fixadora, o gel foi submerso em solução de Nitrato de Prata (composta por 0,10g de AgNO₃ e 50mL de água destilada) também por 10 minutos. Logo em seguida, o gel foi lavado com água destilada e as bandas de interesse foram evidenciadas em 50 mL de solução reveladora contendo Hidróxido de Sódio a 3% e 1 mL de formaldeído (0,1M).

As amostras positivas para o DNA do HPV foram encaminhadas para a purificação de DNA e genotipagem por Sequenciamento Automático de DNA.

5.3.3 - Amplificação do gene β -globina humano

Para verificação da integridade do DNA, as amostras foram testadas pela PCR utilizando-se os iniciadores GH20 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') e PC04 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3') (SAIKI *et al.*, 1988). A segunda reação (*Hemi-nested*) realizada com os iniciadores PC03 (5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3') e PC04 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'), resultaram na amplificação de um fragmento de 110 pb do gene de β -globina humano (SAIKI *et al.*, 1988).

As condições de preparo do Mix de PCR e o Programa de Amplificação utilizado estão descritos nos **Quadros 1, 2 e 3 (Anexo D)**.

Para verificação da amplificação do fragmento do gene da β -globina, foi realizada a corrida eletroforética e a coloração do gel com Nitrato de Prata, como

descrito no item anterior (5.3.2), com a visualização do fragmento de 110 pb do gene de β -globina humano.

5.3.4 - Detecção do DNA do HPV pela Nested-PCR

As amostras de DNA cervicais foram submetidas à detecção do DNA do HPV por *Nested-PCR*. Foram utilizados os oligonucleotídeos genéricos para o HPV: MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3') e MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'). Esses oligonucleotídeos são capazes de amplificar um fragmento de 450 pb do gene *L1* de diversos tipos de HPV (MANOS *et al.*, 1989). As condições utilizadas no Mix da reação, assim como o Programa de Amplificação do PCR específico estão descritos nos **Quadros 4 e 5 (Anexo D)**.

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade e a especificidade na detecção do genoma de HPV nas amostras, a *Nested-PCR* foi utilizada. Os produtos da primeira reação foram submetidos à PCR com os iniciadores genéricos do Papilomavírus: GP5+ (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3') e GP6+ (5'-GAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3') (DE RODA HUSMAN *et al.*, 1995), que amplificam um fragmento de 150 pb interno ao fragmento de 450 pb amplificado na primeira reação do gene *L1* de diversos tipos de HPV. As condições utilizadas no Mix da reação, assim como o Programa de Amplificação do PCR específico estão descritos nos **Quadros 6 e 7 (Anexo D)**.

Uma alíquota de 5 μ l do produto de PCR foi analisada por Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corado com Nitrato de Prata como descrito no item 5.3.2, para a visualização do fragmento de interesse de 150 pb.

As amostras que apresentaram reação positiva para a detecção por *Nested-PCR* do fragmento de 150 pb do genoma viral, foram selecionadas para a genotipagem do HPV pelo Método de Sequenciamento Automático de DNA. Para esse objetivo foi necessária a realização da 2ª reação de *Nested-PCR* em um volume maior de reação (50 μ l) para posterior purificação desse produto. As condições utilizadas no Mix da reação estão exemplificada no **Quadro 8 (Anexo D)**.

O Programa de Amplificação utilizado foi o mesmo descrito no **Quadro 7**. A corrida eletroforética do produto final foi realizado como descrito anteriormente no item 5.3.2. Após a verificação da banda de interesse (150 pb), os 45 μ l restantes da reação

foram submetidos à Eletroforese em gel preparativo de agarose a 2%, para excisão e purificação do fragmento de interesse de 150 pb, como descrito a seguir.

5.3.5 - Genotipagem do HPV por Sequenciamento Automático

Este teste foi realizado no Centro de Pesquisa René Rachou – Fio Cruz - MG, no laboratório de Virologia coordenado pelo Dra. Jaqueline Germano de Oliveira.

Um volume de 45 µL da reação de *Nested-PCR* para o HPV geral, acrescido de 7,5 µL Tampão de amostra 6X (Loading Dye Fermentas) foi submetido à Eletroforese em gel preparativo de agarose a 2%, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 0,5X. A corrida eletroforética dos géis foi realizada em cuba de Eletroforese horizontal (BIO-RAD, Sub-Cell® GT) contendo um volume apropriado de TAE 0,5X, em voltagem inicial de 80 V por 15 minutos, e o restante da corrida por cerca de 1 hora em voltagem de 100 V.

O corante de ácidos nucléicos SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA) foi adicionado ao gel de agarose, na concentração indicada pelo fabricante, para a visualização dos fragmentos de 150 pb do gene *L1* sob a Luz Ultravioleta (UV). Esses fragmentos foram recortados do gel com o auxílio de bisturi, para posterior purificação de DNA pelo Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen®). O DNA purificado foi quantificado em espectrômetro Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific®).

Para a reação de Sequenciamento Automático de DNA foi empregado o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems®, Life Technologies). O Mix da reação foi preparado com 1 µL de Big Dye e tampão (ambos reagentes fornecidos pelo kit), 1 µl do iniciador GP5+ (IDT ®) ou GP6+ (IDT ®) na concentração de 5 pmoles/µl, para o sequenciamento das fitas direta e reversa respectivamente, cerca de 1 a 3 ng do amplicon de 150 pb purificado e H₂O em q.s.p. para o preparo de um volume final de reação de 10µL. A reação para o sequenciamento foi realizada em placa de 96 poços (N801-0560 MicroAmp 96–well Reaction plate, Applied Biosystems®) no Termociclador GeneAmp Thermal Cycler 9700 (Applied Biosystems®). O Programa de Amplificação utilizado está descrito no **Quadro 9 (Anexo D)**.

A fim de se eliminar os iniciadores e os dideoxinucleotídeos marcados com fluorocromos não utilizados na reação, as reações de sequenciamento foram precipitadas adicionando 1 µl de EDTA (125mM), 1 µl de Acetato de Amônio (7,5M) e 50 µl de Etanol (100%) em cada poço da placa de Sequenciamento. Subsequentemente, a placa foi selada e vortexada brevemente. Houve a incubação da placa, em temperatura ambiente (T.A.), por 15 minutos e após esse período, foi centrifugada por 15 minutos a 3700 rpm, em T.A. A placa foi invertida e submetida a uma breve etapa de centrifugação. O DNA precipitado foi desnaturado pela adição de 10 uL de formamida por poço. A corrida foi realizada no Sequenciador Automático capilar ABI 3730 (Life Technologies®).

Para análise dos cromatogramas foi utilizado o software Chromas (Version 2.6.6 - Technelysium Pty Ltd®). Os Contigs foram montados utilizando o software Bioedit Sequence Alignment Editor e, posteriormente, as sequências nucleotídicas foram analisadas pelo programa BLASTN, disponível no link: (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5.4 - Reação de Imuno-histoquímica

Para a realização dos ensaios Imuno-histoquímicos foi utilizado o kit NovoLink Max Polymer Detection Novocastra™ (Leica Microsystems®). Os cortes seriados de 5 µm das amostras parafinadas obtidos em micrótomo, e dispostos sobre lâminas silanizadas foram incubados por 18 horas em estufa a 56°C para aumentar a sua adesão às lâminas. Posteriormente, as lâminas foram submetidas aos seguintes processos: desparafinização com quatro lavagens de 5 minutos em xilol; reidratação com duas lavagens por 5 minutos em álcool 100% e lavagens em série graduada de álcool por 3 minutos (95% - 25%). Por fim, houve a lavagem em água destilada por 3 minutos e lavagem em PBS (sigla inglesa para *Phosphate-Buffered Saline*) 1X por 10 minutos. A recuperação antigênica foi realizada pelo aquecimento das lâminas a 100°C no vapor por 30 minutos em solução tampão de Citrato de Sódio (pH 6,0), utilizando-se a panela de vapor (Suzuki®, modelo SZ-5K118-1).

Após o resfriamento por 20 minutos à T.A., as lâminas foram colocadas em câmara úmida e as soluções do kit NovoLink foram aplicadas seguindo as recomendações do fabricante, com modificação em relação ao tempo de incubação de cada etapa. Após cada etapa houve lavagem dos cortes com PBS 1X.

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

Na etapa de incubação com o anticorpo primário, o anticorpo RAP1 (E-6) (monoclonal de rato, 200 µg/ml) da Santa Cruz Biotechnology® foi incubado à diluição de 1:100. Essa diluição foi definida a partir da realização de experimentos de padronização nos quais foram testadas as diluições de 1:100, 1:200, 1:400, 1:600 do anticorpo primário. Assim, os cortes foram incubados com 100µL do anticorpo primário na diluição de 1:100 por 1 hora à T.A.

Em seguida foi feito o bloqueio pós anticorpo utilizando a solução específica do kit NovoLink por 1 hora e 10 minutos à T.A. Após a etapa de bloqueio, os tecidos foram incubados com o “Sistema Universal de Detecção por Polímeros” do kit NovoLink por 30 minutos à T.A. Para a revelação da marcação foram aplicados 100 µL de solução reveladora contendo Diamino-Benzidina 3,3 (DAB) por 10 minutos à T.A. Para a contra coloração, as lâminas foram mergulhadas em solução de Hematoxilina de Harris (RenyLab®) por 25 segundos. Para finalização e montagem das lâminas, os tecidos foram lavados em água corrente por 5 minutos e, em seguida, houve lavagens em soluções com crescente concentração de álcool (75 % - 100%) por 3 minutos, e 3 banhos em xilol por 5 minutos cada. Após essas lavagens, procedeu-se a montagem das lâminas com lamínulas.

Controles negativos e positivos foram incluídos em cada *batch* de reação. Para controle negativo de cada reação foi feita a substituição do anticorpo primário (RAP1), por 100 µl da solução de PBS 1x. Como controle positivo para a marcação de RAP1 foi utilizada em cada experimento, uma amostra de Carcinoma Escamoso Invasor ou de NIC III.

5.5 - Avaliação das marcações por RAP1

Para análise da marcação por Imuno-histoquímica utilizou-se um Microscópio Óptico convencional e, pelas objetivas de 10X e de 40X, obteve-se a avaliação tecidual das amostras, seguindo alguns critérios semi-quantitativos, propostos por Pascoal-Xavier (2011), e KLAES e colaboradores (2001) com algumas modificações. Para cada parâmetro utilizado foi realizada a estratificação em quatro níveis: nível 0, nível 1, nível 2 e nível 3, como se segue no **Quadro 10**: Os primeiros dois parâmetros,

percentual de células reativas e distribuição das células reativas na espessura do epitélio foram importantes na análise da qualidade do teste imuno-histoquímico, onde pode-se avaliar a qualidade da marcação, a localização da lesão e se a marcação estava concordante ao grau de lesão. Os outros parâmetros, intensidade da reação, localização celular de marcação e semi-quantificação da marcação nuclear, foram importantes na avaliação de RAP1 como um biomarcador.

Quadro 10 - Parâmetros considerados para marcação pela Imuno-histoquímica

Parâmetro	Análise semi-quantitativa
Percentual das células reativas	
Nível 0	Imunorreatividade observada entre 0% e 5% das células;
Nível 1 ou esporádico	Imunorreatividade observada entre 5% - 25% das células;
Nível 2 ou focal	Imunorreatividade observada entre 26% e 50% das células;
Nível 3 ou difuso	Imunorreatividade em mais de 50% das células.
Distribuição das células reativas na espessura do epitélio	
Nível 0	Ausente;
Nível 1 ou terço basal	Imunorreatividade celular presente no terço basal da espessura do epitélio;
Nível 2 ou dois terços	Imunorreatividade celular presente em dois terços da espessura do epitélio;
Nível 3 ou toda a espessura do epitélio	Quando células imunorreativas ocupam todo o epitélio.
Intensidade da reação	
Nível 0	Ausente;
Nível 1 ou fraco	Equivalente a 1+;
Nível 2 ou médio	Equivalente a 2+;
Nível 3 ou forte	Imunorreatividade forte, equivalente a 3+.

Localização celular da marcação	
Nível 0	Ausência de marcação;
Nível 1	Núcleo;
Nível 2	Citoplasma;
Nível 3	Núcleo/ Citoplasma.
Semi-quantificação da marcação nuclear	
Nível 0	Ausência de núcleos marcados;
Nível 1 ou uma cruz	Poucos núcleos marcados;
Nível 2 ou duas cruzes	Marcação nuclear moderada;
Nível 3 ou três cruzes	Marcação nuclear elevada.

5.6 – Aquisição de imagens

Neste trabalho, a obtenção de imagens das amostras cervicais se deu através do Fotomicroscópio Olympus, modelo BX51, utilizando a câmera fotográfica digital Q-Color 3 da Olympus nos aumentos de 10x, 20x e 40x.

5.7- Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA). Para a comparação entre grupos foi realizado o teste estatístico do Qui-quadrado (variáveis categóricas ordinais). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6 – RESULTADOS

6.1 - Análise histopatológica

Um total de 101 amostras de tecido cervical incluídas em parafina foi selecionado para o presente estudo. Registra-se que todas as amostras já haviam recebido um primeiro diagnóstico histopatológico na Instituição de origem. Uma segunda análise histopatológica foi realizada em todas as amostras para a confirmação da presença da lesão. Portanto, o diagnóstico foi revisto e refinado para fins desta pesquisa. As análises foram realizadas no Laboratório de Anatomia Patológica da FM da UFMG.

Como descrito anteriormente na seção de Metodologia nas **Tabelas 1 e 2**, as lesões foram classificadas histopatologicamente como: **i)** Cervicite crônica inespecífica (CE); **ii)** Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV (CEH); **iii)** Neoplasia Intraepitelial Cervical grau I (NIC I); **iv)** Neoplasia Intraepitelial Cervical grau II (NIC II); **v)** Neoplasia Intraepitelial Cervical grau III (NIC III); **vi)** Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado (CCEP); **vii)** Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado (CCEM).

Devido à similaridade do diagnóstico histopatológico e à história da infecção por HPV e com o objetivo de melhorar a acurácia dos testes estatísticos, as amostras dos grupos CEH (6) e NIC I (25) foram agrupadas. Em outra análise, as amostras negativas para neoplasia (CE), as de cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV (CEH) e as de NIC I foram agrupadas. O objetivo seria avaliar a capacidade de RAP1 em diferenciar lesões mais leves e amostras negativas da lesão pré-maligna (NIC III).

Imagens representativas de amostras de tecido cervical portadoras de diferentes diagnósticos histopatológicos são mostrados na **Figura 10**.

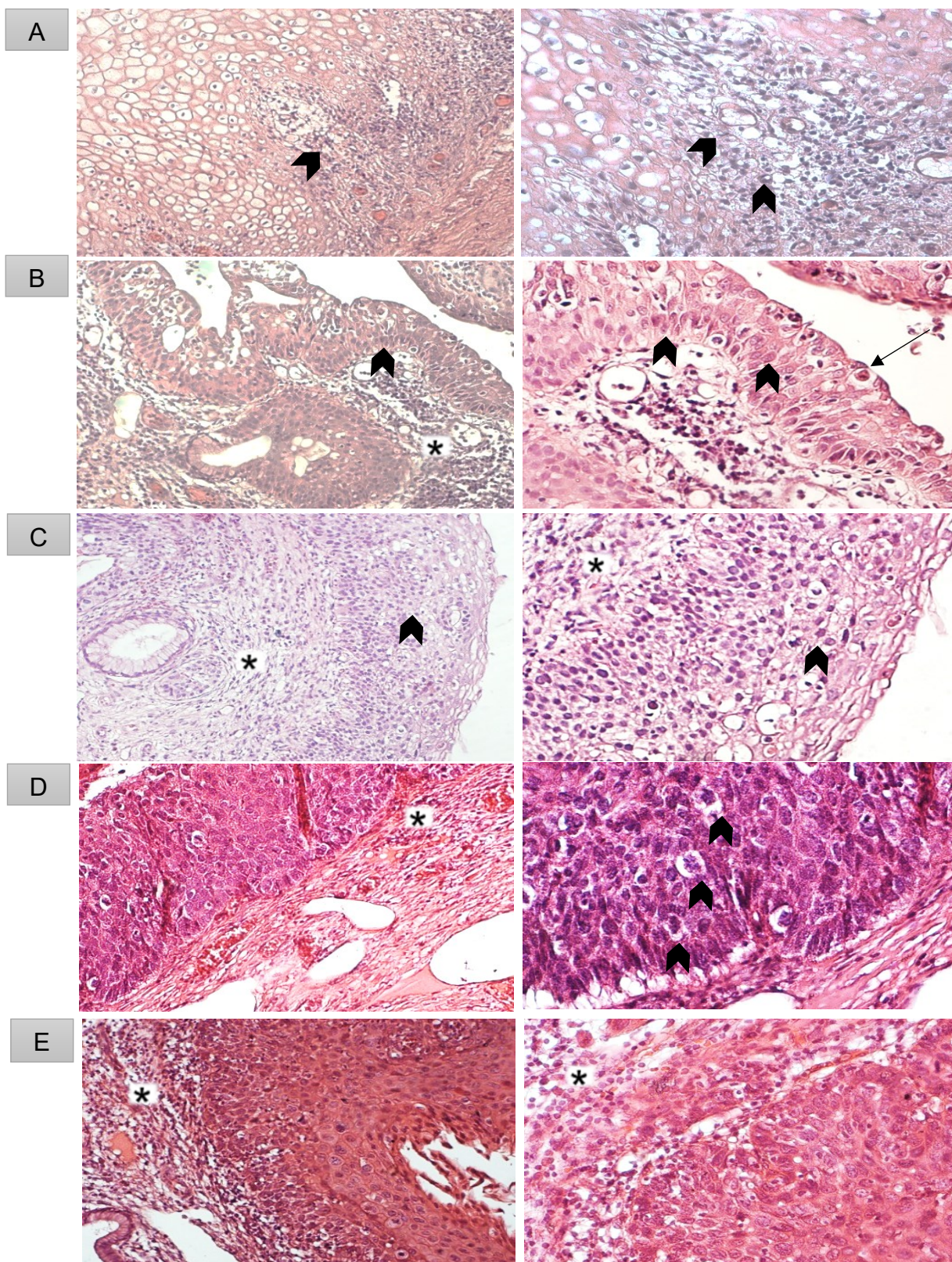


Figura 10 – Fotomicrografias representativas das amostras cervicais utilizadas neste estudo com diferentes Diagnósticos Histopatológicos. Imagens obtidas em fotomicroscópio Olympus, modelo BX51, nos aumentos de 20x e 40x, representadas aqui nas colunas da esquerda e da direita, respectivamente. (A) Amostra de Cervicite crônica inespecífica: observar intenso infiltrado inflamatório no estroma adjacente sem atipias epiteliais celulares (cabeças de seta). (B) NIC I: observar a presença de células indiferenciadas confinadas no terço inferior do epitélio (cabeças de seta) e coilocitose na superfície do tecido (seta). (C) NIC II: observar alterações celulares displásicas restritas aos dois terços inferiores do epitélio (cabeças de seta). (D) NIC III: observar em praticamente toda a espessura do epitélio a perda de polaridade das células e a presença de anormalidades nucleares (cabeças de seta). (E) CCE: Presença de massa de tecido epitelial com evidentes alterações nucleares e/ou citoplasmáticas, invadindo o tecido conjuntivo subjacente. Coloração de HE. Presença de infiltrado composto por pequenos linfócitos no estroma adjacente às lesões em B, C, D e E (*)

6.2 - Verificação da integridade do DNA extraído das amostras cervicais

No presente estudo, a fim de se avaliar a integridade do DNA extraído das amostras cervicais, realizou-se a amplificação do fragmento de 110 pb do gene da β -globina humana por *Hemi-nested* PCR (como descrito no item 5.3.3). A **Figura 11** apresenta resultados obtidos do DNA extraído de amostras cervicais, que apresentaram amplificação positiva do gene de β -globina humana. Neste estudo foram analisadas 99 das 101 amostras de tecido cervical. A exclusão de duas amostras na análise molecular, ocorreu devido a problemas encontrados no decorrer de sua extração e/ou escassez da amostra. Apenas 4 amostras foram negativas para o gene da β -globina humana; porém essas amostras foram utilizadas na *Nested-PCR* para a detecção do genoma do HPV.

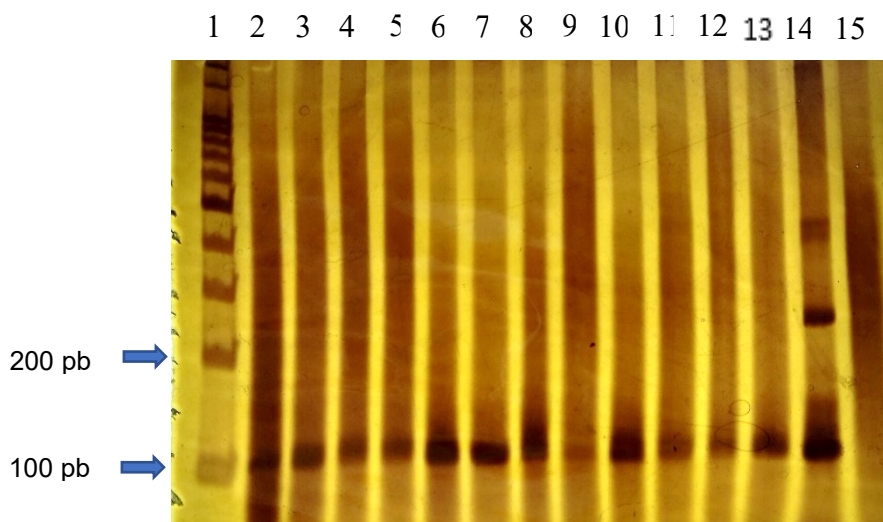


Figura 11 - Verificação da presença do gene da β -globina humana nas amostras cervicais, por Eletroforese em géis de poliacrilamida 6% corados pelo Nitrato de Prata. Gel analítico de poliacrilamida a 6% apresentando o amplicon de 110 pb do gene de beta globina em amostras cervicais. As canaletas 2 a 13 correspondem ao produto de PCR obtido pela análise das amostras cervicais. Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de cultura de células SiHa (Fibroblasto humano infectado com HPV-16 na forma integrada) (canaleta 14). Como padrão de tamanho molecular (canaleta 1) foi utilizado o 100 pb Ladder (Ludwig Biotec®), e como controle negativo da reação foi utilizada água destilada estéril (canaleta 15).

6.3 - Frequência da infecção por HPV

Após a realização da pesquisa do gene de β -globina, foram realizadas as reações de *Nested-PCR* para detecção da infecção por HPV. A **Figura 12** mostra exemplos dos resultados obtidos na amplificação do fragmento de 150 pb do genoma

viral nas amostras cervicais. A **Tabela 3** abaixo sintetiza os resultados obtidos pelas reações de *Nested-PCR* para detecção do HPV.

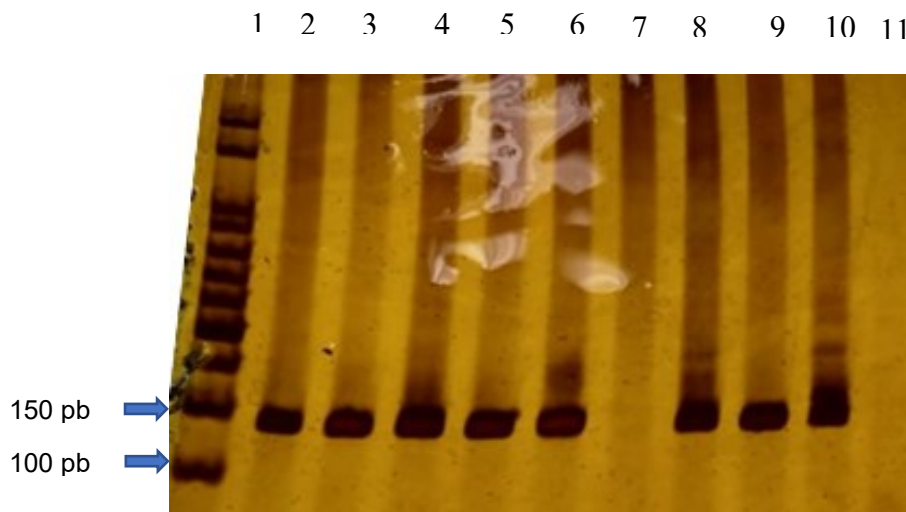


Figura 12 - Verificação da presença do DNA-HPV nas amostras cervicais por Eletroforese em géis de poliacrilamida 6% corados pelo Nitrato de Prata. Gel analítico de poliacrilamida a 6% apresentando o amplicon de 150 pb do gene L1 do HPV geral. As canaletas 2 a 9 correspondem aos produtos obtidos a partir de amostras cervicais. Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de cultura de células SiHa (fibroblasto humano infectado com HPV-16 na forma integrada) (canaleta 10). Como padrão de tamanho molecular (canaleta 1) foi utilizado o 150 pb Ladder (Ludwig Biotec®), e como controle negativo foi utilizada água destilada estéril (canaleta 11).

As amostras negativas para o gene da β -globina humana, também foram testadas para o HPV geral e apresentaram positividade para este DNA viral. Observa-se pela **Tabela 3**, que o DNA-HPV está presente em todos os grupos, com uma positividade de 73,74% (72/99). Nos grupos NIC III e CCE foram encontradas as maiores taxas de positividade, correspondendo a 100% e 94,44% do total de casos analisados em cada grupo, respectivamente. O grupo CE apresentou menor percentual (23,08%) de casos positivos para o DNA-HPV.

Tabela 3 - Detecção do DNA-HPV por *Nested*-PCR nas amostras cervicais.

Resultado	GRUPOS					
	CE	CEH/NIC I	NIC II	NIC III	CCE	TOTAL
	N (% resultado) (% grupo)	N (% resultado) (% grupo)	N (% resultado) (% grupo)	N (% resultado) (% grupo)	N (% resultado) (% grupo)	N (% resultado) (% grupo)
Negativo	10 (37,04) (76,92)	11 (40,74) (35,48)	5 (18,52) (29,41)	0 (0,00) (0,00)	1 (3,70) (5,56)	27 (100,00) (26,26)
Positivo	3 (4,17) (23,08)	20 (27,77) (64,52)	12 (16,67) (70,59)	20 (27,78) (100,00)	17 (23,61) (94,44)	72 (100,00) (73,74)
TOTAL	13 (13,13) (100,00)	31 (31,31) (100,00)	17 (17,17) (100,00)	20 (20,20) (100,00)	18 (18,18) (100,00)	99 (100,00) (100,00)

CE: Cervicite crônica inespecífica; CEH/NIC I: Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV e Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1; NIC II: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 2; NIC III: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3; CCE: Carcinoma de Células Escamosas.

6.4 - Genotipagem do HPV nas Amostras Cervicais

Os resultados de Genotipagem obtidos pelo Sequenciamento do DNA do fragmento de 150 pb do gene *L1* estão sintetizados na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Genotipagem do HPV detectado nos diferentes grupos de amostras.

HPV	GRUPOS					
	CE	CEH/NIC I	NIC II	NIC III	CCE	Total
	N (% resultado) (% grupo)	N (% resultado) (% grupo)	N (% resultado) (% grupo)	N (% resultado) (% grupo)	N (% resultado) (% grupo)	N (% resultado) (% grupo)
16	2 (4,26) (100)	11 (23,41) (73,32)	5 (10,64) (50,00)	15 (31,90) (78,95)	14 (29,79) (87,50)	47 (100,00) (75,81)
31	-	1 (25,00) (6,67)	3 (75,00) (30,00)	-	-	4 (100,00) (6,452)
33	-	-	1 (33,33) (10,00)	2 (66,67) (10,53)	-	3 (100,00) (4,848)
35	-	1 (100,00) (6,67)	-	-	-	1 (100,00) (1,61)
70	-	1 (100,00) (6,67)	-	-	-	1 (100,00) (1,61)
45	-	-	1 (50,00) (10,00)	-	1 (50,00) (6,25)	2 (100,00) (3,23)
52	-	-	-	-	1 (100,00) (6,25)	1 (100,00) (1,61)
58	-	-	-	1 (100,00) (5,26)	-	1 (100,00) (1,61)
53	-	1 (100,00) (6,67)	-	-	-	1 (100,00) (1,61)
18	-	-	-	1 (100,00) (5,26)	-	1 (100,00) (1,61)
Total	2 (3,23) (100,00)	15 (24,19) (100,00)	10 (16,13) (100,00)	19 (30,64) (100,00)	16 (25,81) (100,00)	62 (100,00) (100,00)

CE: Cervicite crônica inespecífica; CEH/NIC I: Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV e Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1; NIC II: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 2; NIC III: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3; CCE: Carcinoma de Células Escamosas.

O genótipo do HPV 16 foi o mais prevalente nas amostras cervicais, representando 75,81% de todas as amostras genotipadas. Destacou-se sua prevalência em todos os grupos pesquisados.

A **Figura 13** exibe parte do Cromatograma gerado após a reação de Sequenciamento.

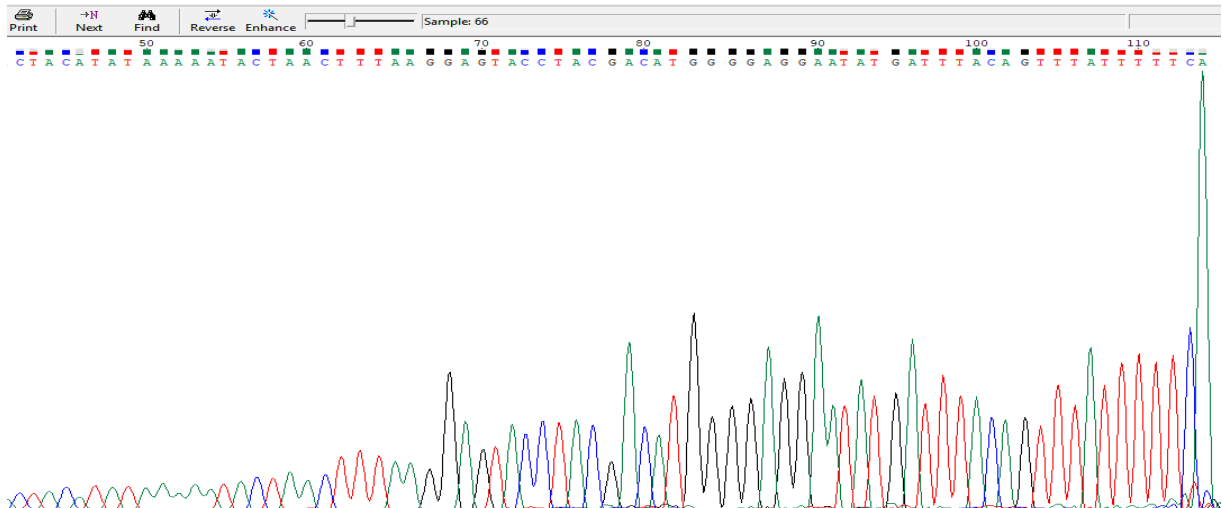


Figura 13 - Cromatograma parcial gerado pelo Sequenciador Automático Capilar ABI 3730 (Life Technologies). Cromatograma gerado pelo Sequenciamento do amplicon de 150 pb do gene *L1* do HPV amplificado de uma amostra cervical (nucleotídeos de 50 a 110).

6.5 – Análise Imuno-histoquímica da Expressão de RAP1

Devido a problemas pré-analíticos processuais que interferem na reação de Imuno-histoquímica, em onze amostras, não foi possível realizar a avaliação da marcação de RAP1. A **Tabela 5** representa o n amostral das amostras analisadas por Imuno-histoquímica para RAP1.

Tabela 5 – Amostras Cervicais que foram submetidas à análise Imuno-histoquímica (IHQ) para RAP1.

Grupos de Diagnóstico Histopatológico	N amostral Inicial	N amostral IHQ
CE	13	12
CEH	6	5
NIC I	25	19
NIC II	17	17
NIC III	20	18
CCE	20	19
Total	101	90

6.5.1 – Marcação por Imuno-histoquímica de RAP1 nas amostras cervicais

A **Figura 14** exibe imagens representativas da Imunomarcação para RAP1, observada em amostras de tecido cervical com distintos diagnósticos Histopatológicos. A expressão do biomarcador RAP1 mostrou-se presente em todos os grupos com e sem lesão cervical.

Amostras de tecido cervical diagnosticadas como Cervicite crônica inespecífica (CE) apresentaram marcação citoplasmática da proteína em toda a espessura do epitélio, com acima de 50% das células epiteliais reativas (**Figura 14 A1, A2, A3**).

Nas mostras de tecido do grupo de Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral por HPV (CEH), observou-se forte marcação citoplasmática de 3/3 do Epitélio Cervical (**Figura 14 B**). Contudo, a maioria das amostras desse grupo apresentou marcação de intensidade moderada, e ausência de marcação estritamente nuclear. Presença de infiltrados inflamatórios em áreas do tecido conjuntivo adjacente foram observadas nas amostras com Cervicite (**Figura 14 A e 14 B**).

Amostras de tecido cervical portadoras de NIC I, exibiram distribuição da marcação para RAP1 no terço inferior do epitélio, com intensidade de marcação variando de moderada (na maioria das amostras) a forte (**Figura 14 C**). A

Imunomarcacão foi observada tanto no Núcleo quanto no Citoplasma de células epiteliais com alteraçōes (**Figura 14 C**).

Amostras cervicais do grupo NIC II apresentaram intensidade de marcação variável (fraca, moderada e forte), localizada nos 2/3 basais da área lesionada do Epitélio Cervical, com predomínio de marcação por RAP1 nuclear e citoplasmática (**Figura 14 D**).

Forte Imunomarcacão para RAP1 foi observada em 3/3 do epitélio das amostras de tecido cervical classificadas como NIC III, com concomitante marcação, nuclear e citoplasmática na totalidade das amostras analisadas. Um grande percentual de células marcadas pode ser observado nas amostras de NIC III (**Figura 14 E**).

Em nosso estudo verificou-se marcação de RAP1 de forte intensidade na maioria das amostras portadoras de Câncer cervical, embora algumas amostras tenham apresentado moderada marcação. Numerosas células reativas foram observadas nas massas de tecido tumoral invadindo o estroma, e, ocasionalmente, o tecido glandular. Predomínio de concomitante Imunomarcacão para RAP1 no Núcleo e Citoplasma foi observado nas amostras de Câncer cervical.

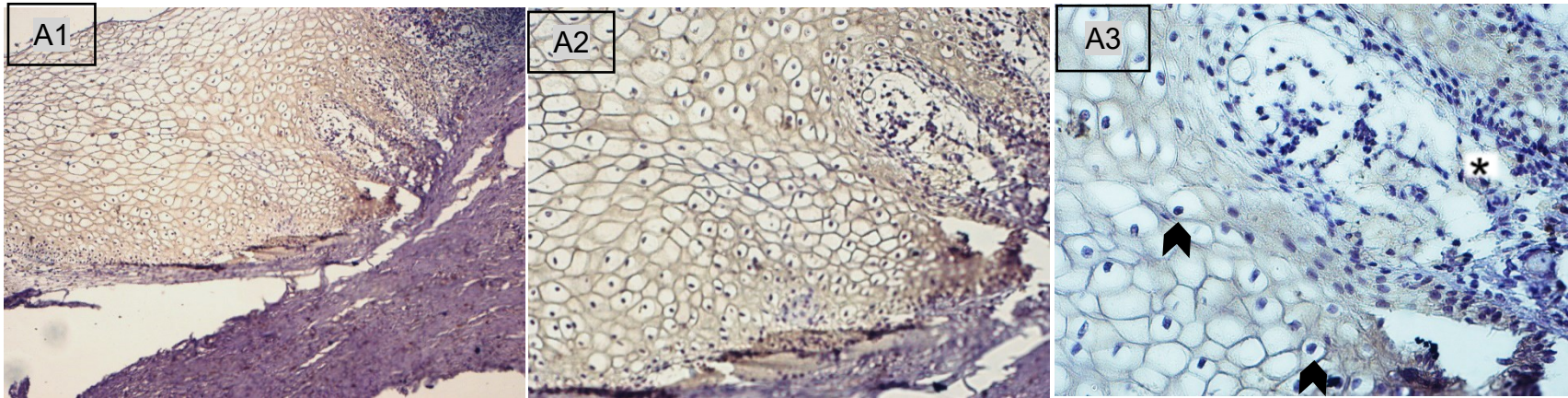
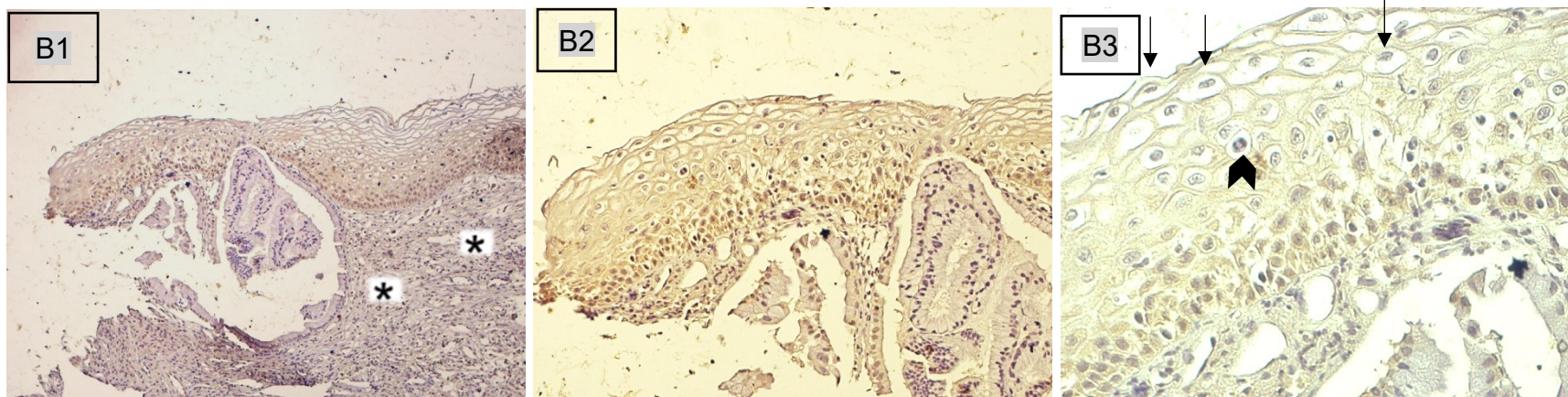
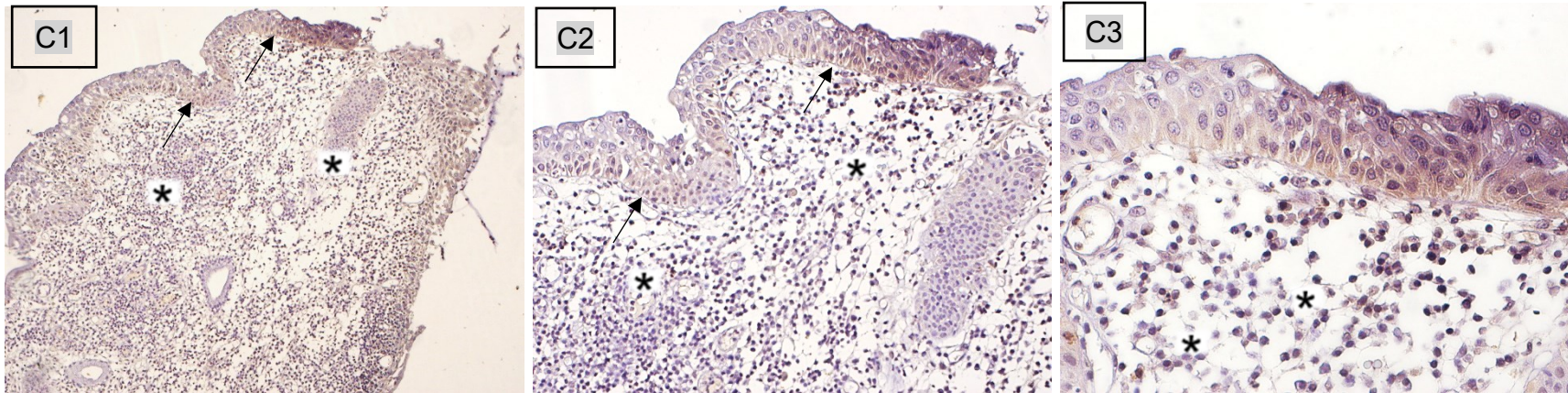


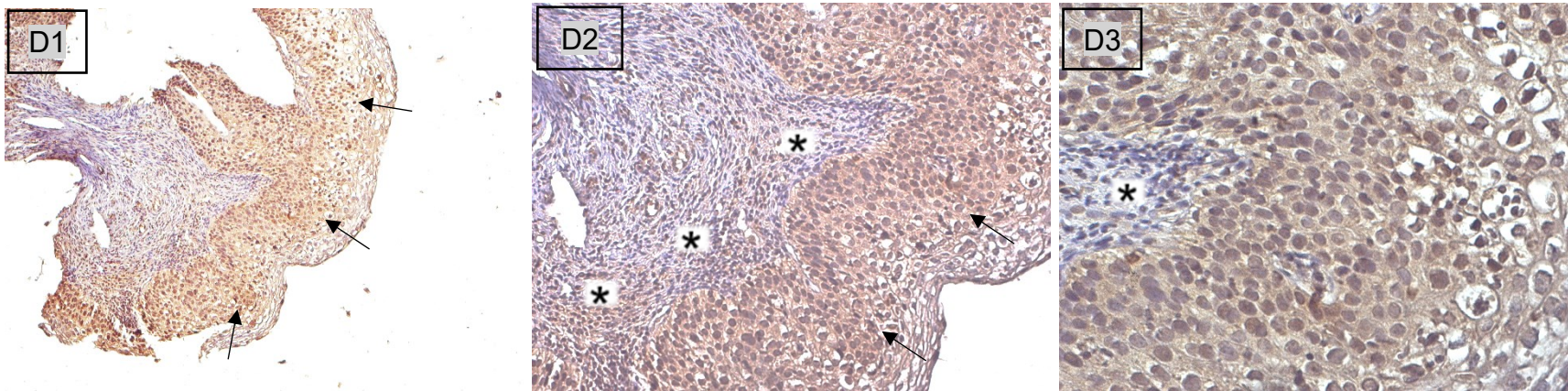
Figura 14 - Expressão da proteína RAP1 em amostras de tecido cervical pela utilização da técnica de Imuno-histoquímica. Imagens obtidas através de fotomicroscópio Olympus, modelo BX51, nos aumentos de 10x, 20x e 40x, representadas aqui nas colunas da esquerda e da direita, respectivamente. A1, 2, 3- Grupo Cervicite crônica inespecífica: Epitélio Estratificado cervical composto por células diferenciadas sem alterações, e ricas em vacúolos de glicogênio citoplasmáticos (cabeças setas). Presença de Infiltrado inflamatório focal no estroma adjacente (*). Imunomarcagem para RAP1 em toda a espessura do epitélio. Predomínio de forte marcação citoplasmática, com acima de 50% de células reativas.



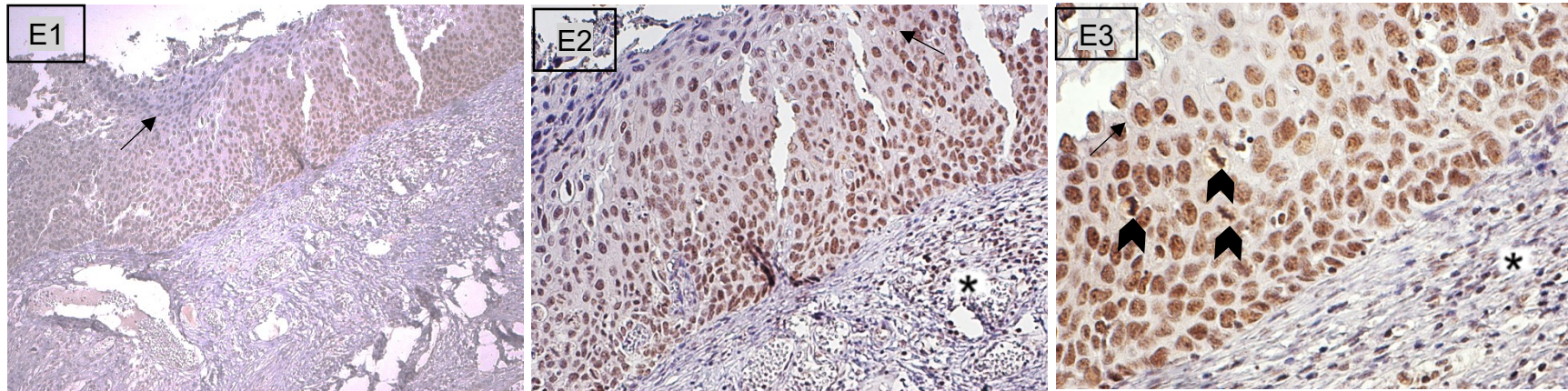
B1, 2, 3 - Grupo Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV: Epitélio Estratificado Escamoso com ausência de anormalidades celulares; presença de células em mitose no terço médio (cabeça de seta), e coilócitos na superfície epitelial (setas). Infiltrados inflamatórios difusos no estroma adjacente (*). Observa-se forte marcação para RAP1 em 3/3 do Epitélio cervical. Presença de marcação nuclear e citoplasmática (B2 e B3).



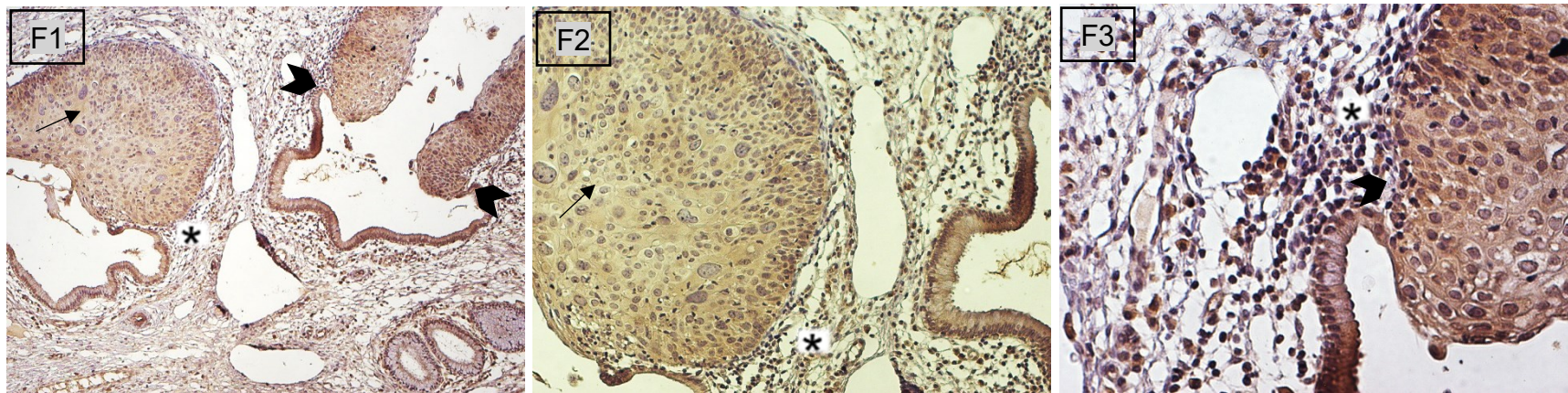
C1, 2 e 3 - Grupo NIC I: presença de células basais no terço basal do Epitélio (seta). Intensos infiltrados de células inflamatórias no estroma adjacente à lesão (*). Verifica-se marcação moderada para RAP1 no terço basal do Epitélio. Observa-se marcação nuclear e citoplasmática (C2 e C3).



D1, 2, 3 - Grupo NIC II: observar alterações celulares nas células dos 2/3 basais do Epitélio Estratificado Escamoso (setas). Presença de Infiltrado inflamatórios focais e difusos no estroma adjacente (*). Intensa marcação para RAP1 visualizada em 2/3 do Epitélio Cervical. Predomínio de marcação Nuclear e Citoplasmática da área da lesão (D2 e D3).



E1, 2, 3 - NIC III: presença de células indiferenciadas e anormais em toda a espessura do epitélio, com perda de polaridade do Epitélio Estratificado (setas). Figuras atípicas de Mitose (cabeças de seta), Infiltrado inflamatório difuso (*). Observa-se intensa marcação para RAP1 em 3/3 da área de lesão do Epitélio Cervical. Predomínio de marcação Nuclear (E2, E3).



F1, 2, 3 - Carcinoma de Células Escamosas: Presença de massas de tecido tumoral no estroma, com células epiteliais anormais, invadindo o tecido glandular adjacente (cabeças de seta). Infiltrado linfocitário circundando o tecido tumoral (*). Forte Imunomarcagem para RAP1 nas células Epiteliais, assim como no Epitélio Glandular. Presença de marcação Nuclear e Citoplasmática de células Epiteliais no interior da lesão (F2 e F3). Marcação para RAP1 também observada em Linfócitos mononucleares de infiltrados adjacentes à lesão (F3).

6.5.2 – Avaliação da Imuno-histoquímica por RAP1

Para cada grupo categorizado na **Tabela 5**, foram empregadas análises segundo os parâmetros: **(i)** Percentual das células reativas; **(ii)** Distribuição das células reativas na espessura do epitélio, **(iii)** Intensidade da reação, **(iv)** Localização celular da marcação nas células, **(v)** Semi-quantificação da marcação nuclear.

6.5.2.1 – Avaliação da Imuno-histoquímica por RAP1 através do parâmetro Percentual das células reativas em amostras cervicais

De 90 amostras submetidas à Imuno-histoquímica, 71 (79%) foram enquadradas na categoria nível 3, independente do grau de lesão. A única amostra que apresentou ausência de marcação foi diagnosticada com NIC I. Nesta análise o valor de p encontrado foi de 0,040 (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Avaliação do Percentual das células reativas por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais.

Nível	GRUPOS						Valor p
	CE	CEH/NIC I	NIC II	NIC III	CCE	TOTAL	
	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	
Percentual							
0 ou < 5%	-	1	-	-	-	1	
	-	(100)	-	-	-	(100)	
	-	(4)	-	-	-	(1)	
1 ou Esporádico (5% - 25%)	-	2	1	-	1	4	
	-	(50)	(25)	-	(25)	(100)	
	-	(8)	(6)	-	(5)	(4)	
2 ou Focal (26% - 50%)	6	1	3	-	4	14	
	(43)	(7)	(21)	-	(29)	(100)	
	(50)	(4)	(18)	-	(21)	(16)	
3 ou Difuso (>50%)	6	20	13	18	14	71	
	(9)	(28)	(18)	(25)	(20)	(100)	
	(50)	(84)	(76)	(100)	(74)	(79)	
Total	12	24	17	18	19	90	0,040
	(13)	(27)	(19)	(20)	(21)	(100)	
	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	

CE: Cervicite crônica inespecífica; CEH/NIC I: Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV e Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1; NIC II: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 2; NIC III: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3; CCE: Carcinoma de Células Escamosas.

Os dados apresentados na **Tabela 6** podem ser analisados na **Figura 15**.

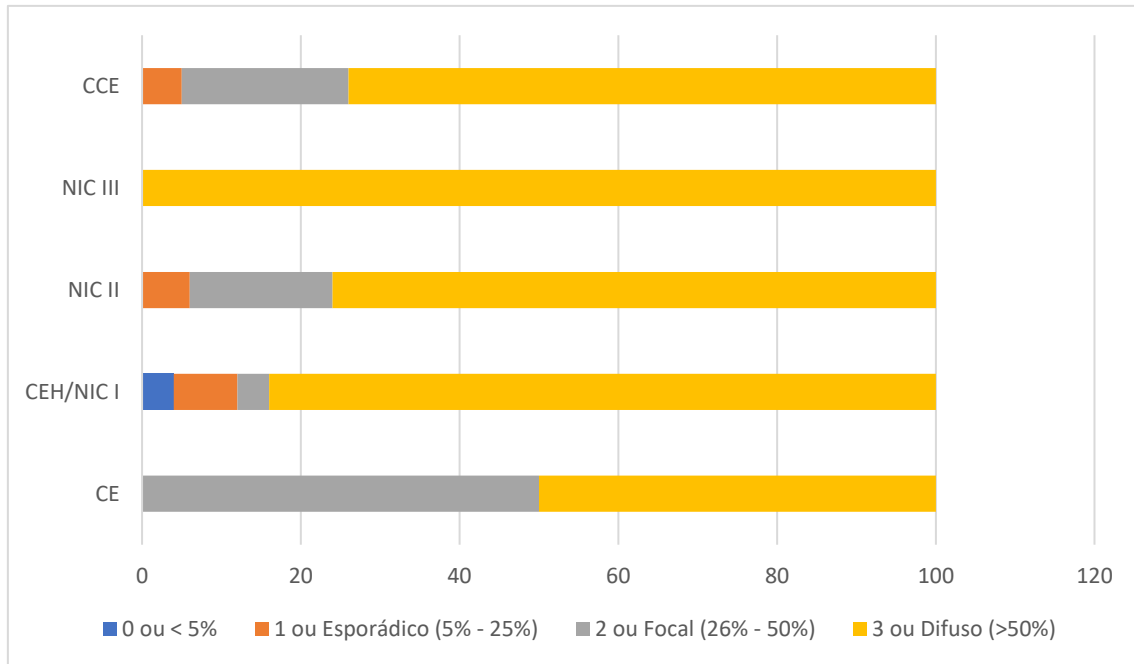


Figura 15 - Avaliação do percentual das células reativas na Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais. CE: Cervicite crônica inespecífica; CEH/NIC I: Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV e Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1; NIC II: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 2; NIC III: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3; CCE: Carcinoma de Células Escamosas. * p valor: 0,040.

Pode-se observar que houve diferença estatística observada ($p= 0,040$) entre os grupos por este parâmetro estudado.

Para a construção da **Figura 16**, os grupos CE e CEH/NIC I foram agrupados, assim como os grupos NIC II/III e CCE com o objetivo de avaliar a capacidade deste parâmetro em identificar as mulheres com real risco de progressão para o Câncer do colo do útero.

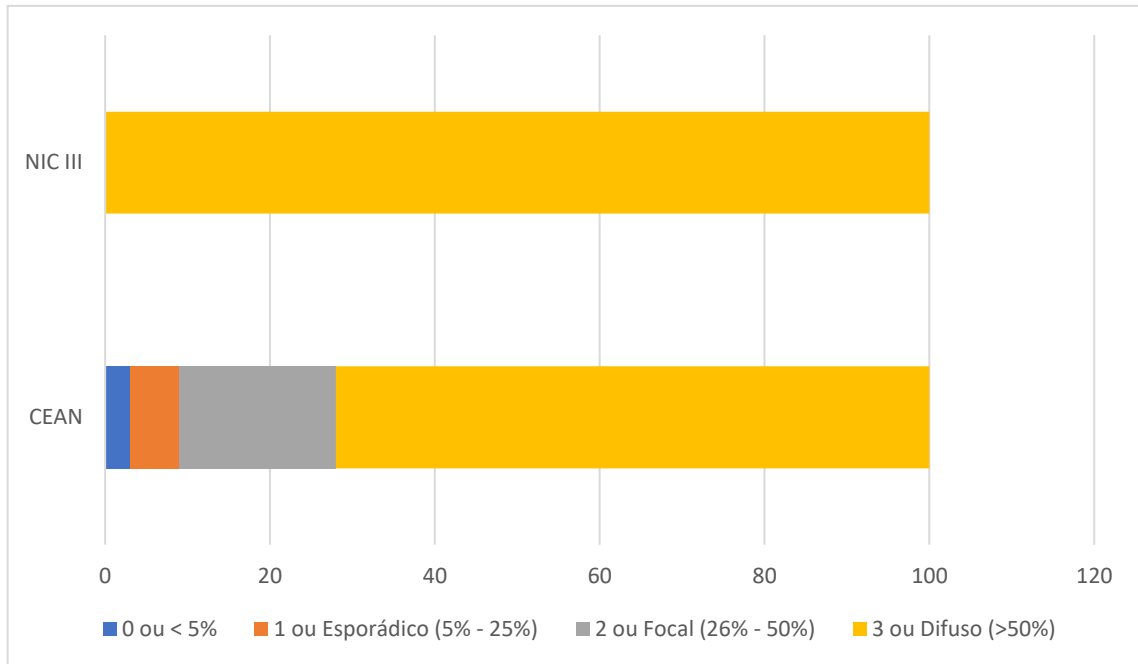


Figura 16 - Avaliação do percentual das células reativas na Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais agrupadas conforme o risco da paciente evoluir para câncer. CEAN: Cervicite crônica inespecífica, Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV; NIC III: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3. * p valor: 0,105.

Pela análise do gráfico pode-se observar que o parâmetro estudado não foi capaz de identificar o grupo de maior risco para evolução do câncer, não havendo diferença estatística observada ($p= 0,105$).

Amostras de CCE ($n=19$) foram classificadas em Carcinoma de Células Escamosas pouco diferenciado ($n=7$) e de Células Escamosas moderadamente diferenciado ($n=12$). O Percentual de células reativas, apresentados por amostras de CCE dos dois grupos nos seus diferentes níveis, encontra-se representado na **Figura 17**.

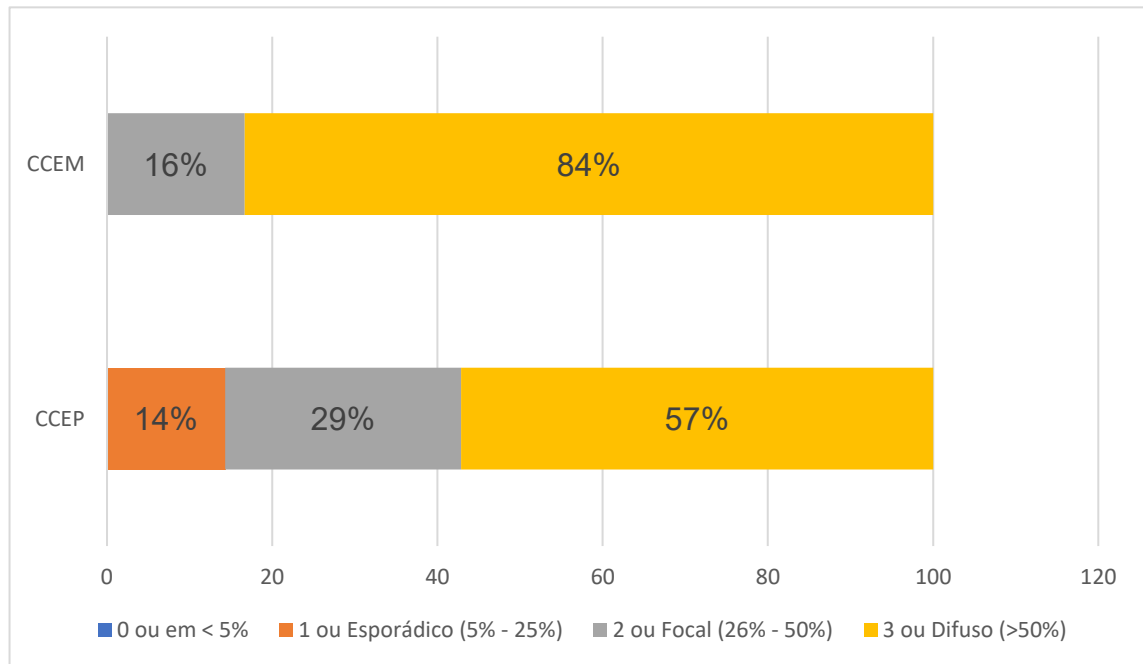


Figura 17- Avaliação do percentual das células reativas na Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras de CCE. CCEP: Carcinoma de Células Escamosas pouco diferenciado; CCEM: Carcinoma de Células Escamosas moderadamente diferenciado. * p valor: 0,343.

Na análise da **Tabela 6** observa-se que a maior parte das amostras do grupo de CCE (18/19, 95%), independente de sua classificação, foram categorizadas nos níveis 2 (4) e 3 (14). Ao se comparar os diferentes tipos de CCE, moderadamente diferenciado ou pouco diferenciado, não se observou diferença estatística entre estes grupos ($p = 0,343$).

6.5.2.2 – Avaliação da Imuno-histoquímica por RAP1 através do parâmetro Distribuição das células reativas em amostras cervicais

Os resultados obtidos na análise de Distribuição das células reativas encontram-se na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Avaliação da Distribuição das células reativas na Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 na espessura do epitélio cervical.

Nível	GRUPOS					Valor p
	CE	CEH/NIC I	NIC II	NIC III	TOTAL	
	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	
Distribuição						
0 ou Negativo	-	1	-	-	1	
	-	(100)	-	-	(100)	
	-	(4)	-	-	(1)	
1 ou Terço basal	4	18	1	-	23	
	(18)	(78)	(4)	-	(100)	
	(33)	(75)	(6)	-	(32)	
2 ou Dois terços	3	2	16	-	21	
	(14)	(10)	(76)	-	(100)	
	(25)	(8)	(94)	-	(30)	
3 ou Três terços	5	3	-	18	26	
	(19)	(12)	-	(69)	(100)	
	(42)	(13)	-	(100)	(37)	
TOTAL	12	24	17	18	71	<0,001
	(17)	(34)	(24)	(25)	(100)	
	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	

CE: Cervicite crônica inespecífica; CEH/NIC I: Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV e Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1; NIC II: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 2; NIC III: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3.

Observa-se que em maior parte das amostras cervicais, a distribuição celular da marcação de RAP1 por Imuno-histoquímica, acompanha, em sua predominância, a distribuição da lesão neoplásica na espessura da lesão tecidual. Nos grupos CE, em que há ausência de lesão, a distribuição tecidual da marcação está presente nos níveis (1, 2, 3). Foi encontrada diferença estatística ($p < 0,001$) (**Tabela 7**).

Na **Figura 18** há a representação dos dados apresentados na **Tabela 7**, onde se observa com maior clareza que a marcação de RAP1 acompanha os níveis de distribuição na espessura do epitélio. Dessa forma, tem-se o predomínio de amostras de CEH/NIC I no nível 1 (laranja), de NIC II no nível 2 (cinza) e de NIC III no nível 3 (amarelo).

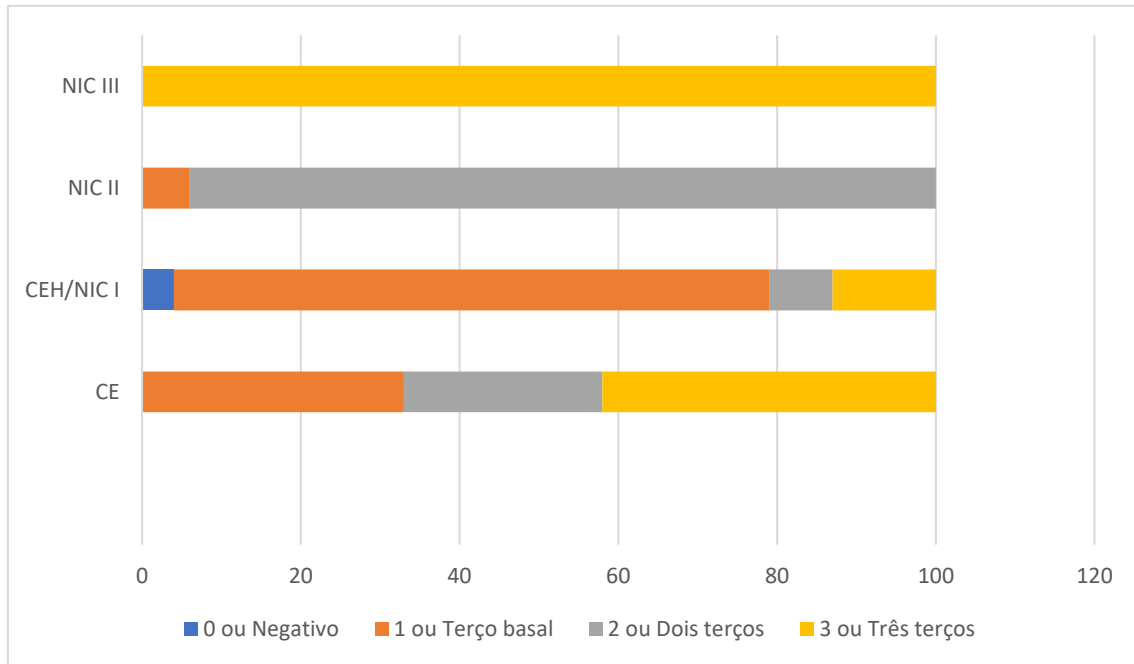


Figura 18 - Avaliação da Distribuição das células reativas na Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 na espessura do epitélio cervical. CE: Cervicite crônica inespecífica; CEH/NIC I: Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV e Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1; NIC II: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 2; NIC III: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3. * p valor: <0,001.

Para visualizar a capacidade deste parâmetro em auxiliar no diagnóstico da progressão para o Câncer de colo uterino, os grupos CE e CEH/NIC I foram agrupados (Figura 19).

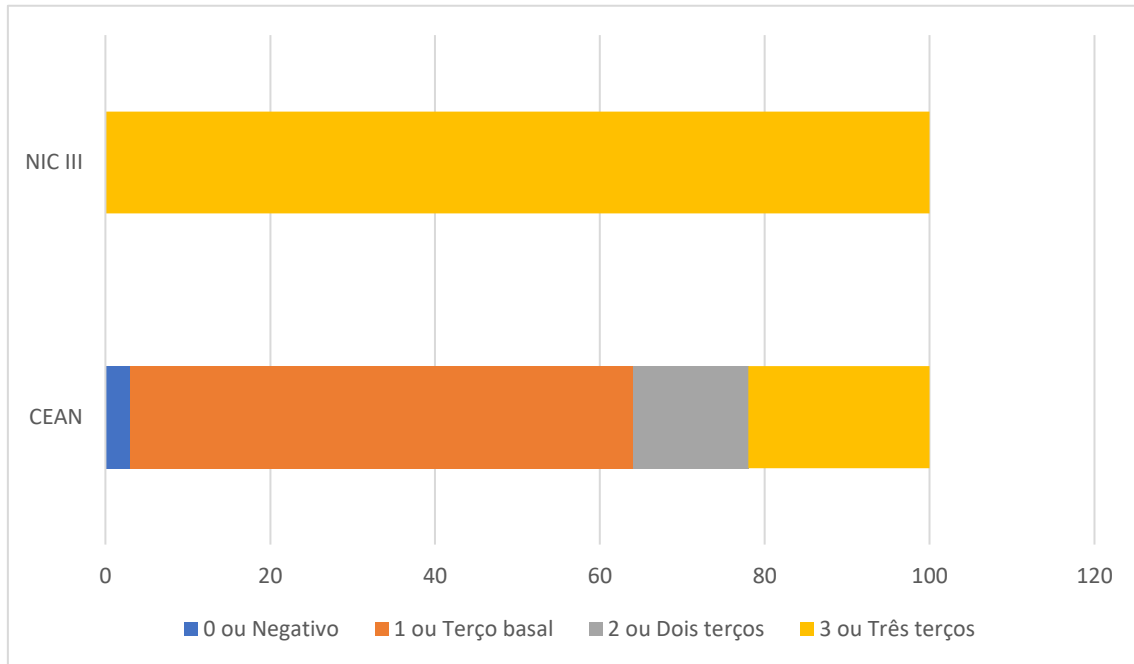


Figura 19 - Avaliação da Distribuição das células reativas na Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais agrupadas conforme o risco da paciente evoluir para câncer. CEAN: Cervicite crônica inespecífica, Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV e Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1; NICs III: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3. * p valor: <0,001.

Observa-se pela análise desse parâmetro a capacidade da Imunomarcção por RAP1, em avaliar a progressão das lesões do colo do útero. No grupo CEAN o predomínio da marcação foi no nível 1 (61%), já no grupo NICs III a marcação ficou distribuída no nível 3 (100%). Na análise estatística, o valor de p foi significativo (<0,001).

6.5.2.3 – Avaliação da Imuno-histoquímica por RAP1 através do parâmetro da Intensidade da marcação em amostras cervicais

Os resultados encontram-se descritos na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Avaliação da Intensidade da marcação por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais.

Nível	GRUPOS						Valor p
	CE	CEH/NIC I	NIC II	NIC III	CCE	TOTAL	
	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	
Intensidade							
0 ou Negativo	-	1	-	-	-	1	
	-	(100)	-	-	-	(100)	
	-	(4)	-	-	-	(1)	
1 ou Fraco	2	7	8	1	3	21	
	(10)	(33)	(38)	(5)	(14)	(100)	
	(17)	(29)	(47)	(6)	(16)	(23)	
2 ou Médio	7	12	6	6	4	35	
	(20)	(34)	(17)	(17)	(12)	(100)	
	(58)	(50)	(35)	(33)	(21)	(39)	
3 ou Forte	3	4	3	11	12	33	
	(9)	(12)	(9)	(33)	(37)	(100)	
	(25)	(17)	(18)	(61)	(63)	(37)	
TOTAL	12	24	17	18	19	90	0,013
	(13)	(27)	(19)	(20)	(21)	(100)	
	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	

CE: Cervicite crônica inespecífica; CEH/NIC I: Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV e Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1; NIC II: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 2; NIC III: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3; CCE: Carcinoma de Células Escamosas.

Ao se avaliar o parâmetro de Imuno-histoquímica para Intensidade da Imunomarcção de RAP1, a predominância da marcação encontra-se no nível médio, equivalente a 2+, e no nível forte, equivalente a 3+, correspondendo respectivamente 39% e 37% do total de 90 amostras. Percebe-se que com a gravidade da lesão tecidual, há o aumento da intensidade de marcação para RAP1, já que no nível 3 as maiores proporções estão no grupo de NIC III e CCE, 33% e 37%, respectivamente (**Tabela 8**). Na análise estatística, houve correlação entre os grupos (p valor: 0,013).

Na **Figura 20**, há a representação dos dados apresentados na **Tabela 6**, onde observa-se que os níveis de intensidade estão distribuídos em todos os grupos, de forma heterogênea.

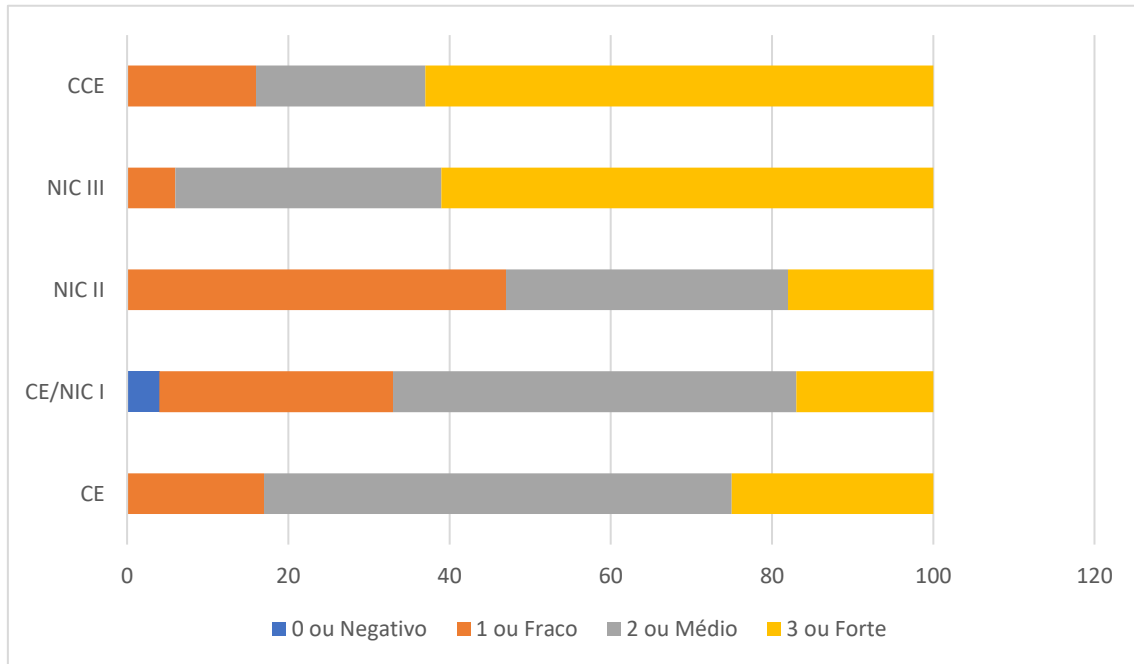


Figura 20 - Avaliação da intensidade da marcação por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais. CE: Cervicite crônica inespecífica; CEH/NIC I: Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV e Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1; NIC II: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 2; NIC III: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3; CCE: Carcinoma de Células Escamosas.* p valor: 0,013.

Para avaliar a capacidade de distinção entre lesões leves e graves do colo do útero, construiu-se a **Figura 21**. Nessa figura, os grupos de CE e CEH/NIC I foram unidos.

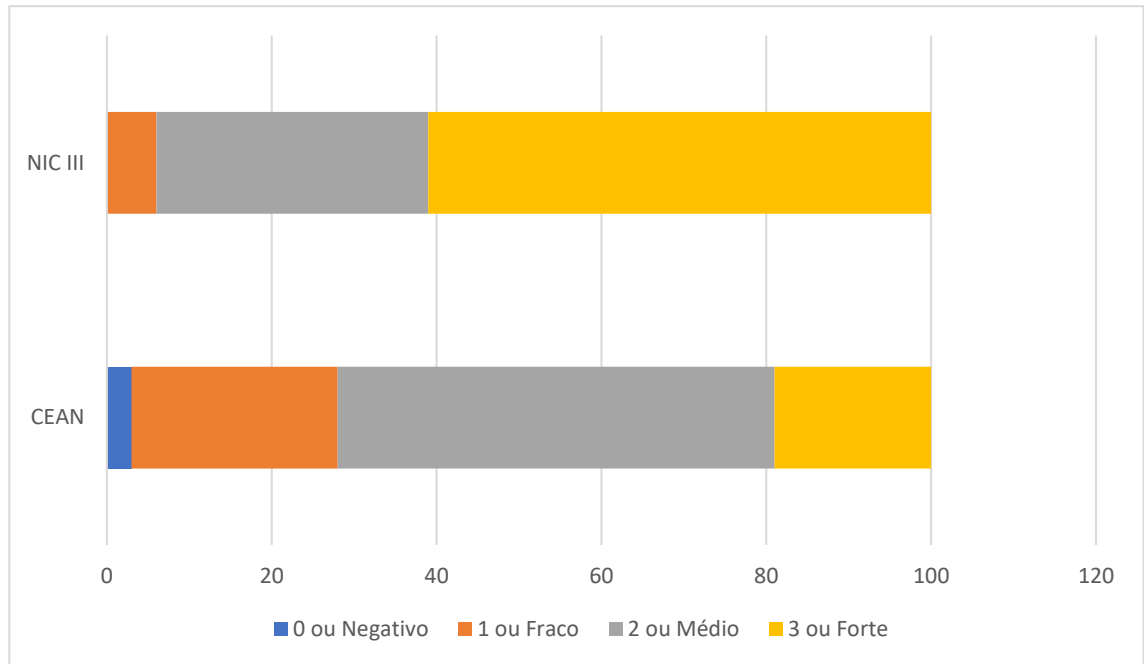


Figura 21 - Avaliação da intensidade da marcação por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais agrupadas conforme o risco da paciente evoluir para câncer. CEAN: Cervicite crônica inespecífica, Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV e Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1; NICs III: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3. * p valor: 0,017.

Percebe-se que quanto mais grave a lesão, há a tendência de aumentar a intensidade da reação. Na análise estatística, houve diferença estatística entre os grupos ($p = 0,017$).

Além dessas análises, as amostras de Carcinoma de Células Escamosas Pouco Diferenciado e Moderadamente Diferenciado foram investigadas segundo o parâmetro Intensidade da marcação. Essa análise está representada na **Figura 22**.

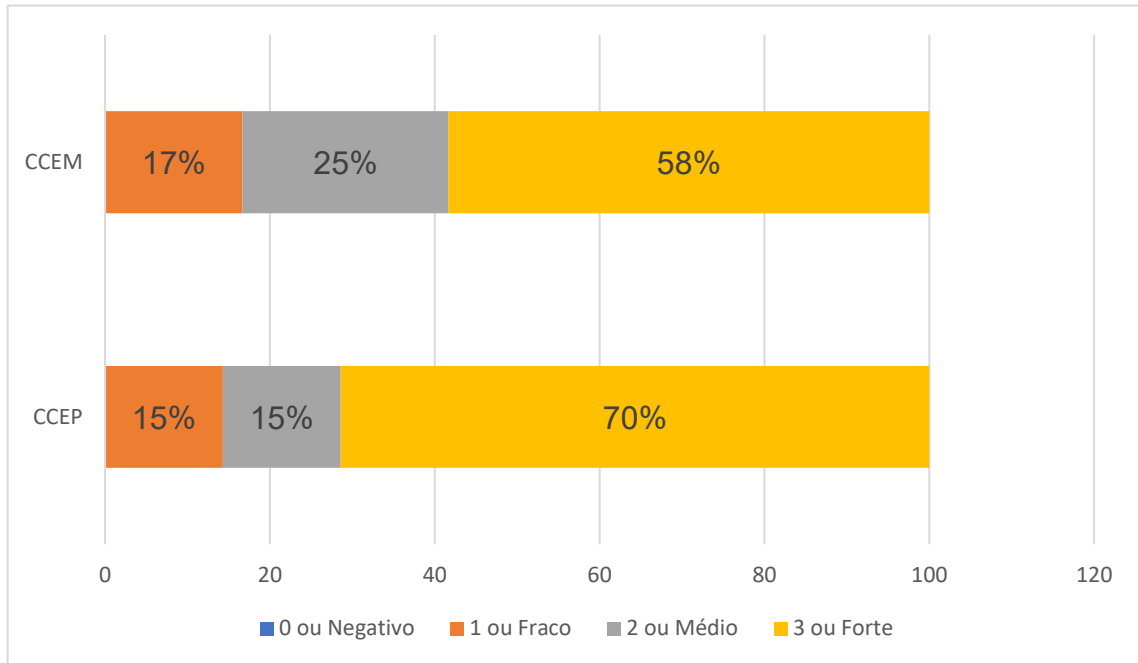


Figura 22 - Avaliação da intensidade da marcação por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 em amostras cervicais de CCE. CCEP: Carcinoma de Células Escamosas pouco diferenciado; CCEM: Carcinoma de Células Escamosas moderadamente diferenciado. * p valor: 0,828.

Ao analisar o gráfico, percebe-se que independente do grau de diferenciação do grupo de CCE, este apresenta o predomínio de marcação forte (nível 3). Com esta análise não houve diferença estatística ($p= 0,828$).

6.5.2.4 – Avaliação da Imuno-histoquímica por RAP1 através do parâmetro Localização Celular da marcação em amostras cervicais

Os resultados encontram-se descritos na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Avaliação da Localização celular por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais.

Nível	GRUPOS						Valor p
	CE	CEH/NIC I	NIC II	NIC III	CCE	TOTAL	
	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	
Localização celular							
Ausência de marcação	-	1 (100)	-	-	-	1 (100)	
	-	(4)	-	-	-	(1)	
Núcleo	-	1 (25)	-	-	3 (75)	4 (100)	
	-	(4)	-	-	(16)	(4)	
Citoplasma	4 (17,5)	12 (52)	3 (13)	-	4 (17,5)	23 (100)	
	(33)	(50)	(18)	-	(21)	(26)	
Núcleo/ Citoplasma	8 (13)	10 (16)	14 (23)	18 (29)	12 (19)	62 (100)	
	(67)	(42)	(82)	(100)	(63)	(69)	
TOTAL	12 (13) (100)	24 (27) (100)	17 (19) (100)	18 (20) (100)	19 (21) (100)	90 (100) (100)	0,008

CE: Cervicite crônica inespecífica; CEH/NIC I: Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV e Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1; NIC II: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 2; NIC III: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3; CCE: Carcinoma de Células Escamosas.

O parâmetro de Imuno-histoquímica para a Localização Celular de RAP1, está predominantemente na marcação concomitante de núcleo e do citoplasma, representando 69% do total de 90 amostras cervicais. A marcação exclusiva de núcleos está restrita a uma pequena proporção de amostras cervicais (4%), onde são encontradas amostras de CEH/NIC I e CCE, que representam 4% e 16% de cada grupo avaliado, respectivamente. A marcação exclusiva de citoplasma está distribuída em todos os grupos. Na análise estatística, houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,008$).

Na **Figura 23**, há a representação dos dados apresentados na **Tabela 9**.

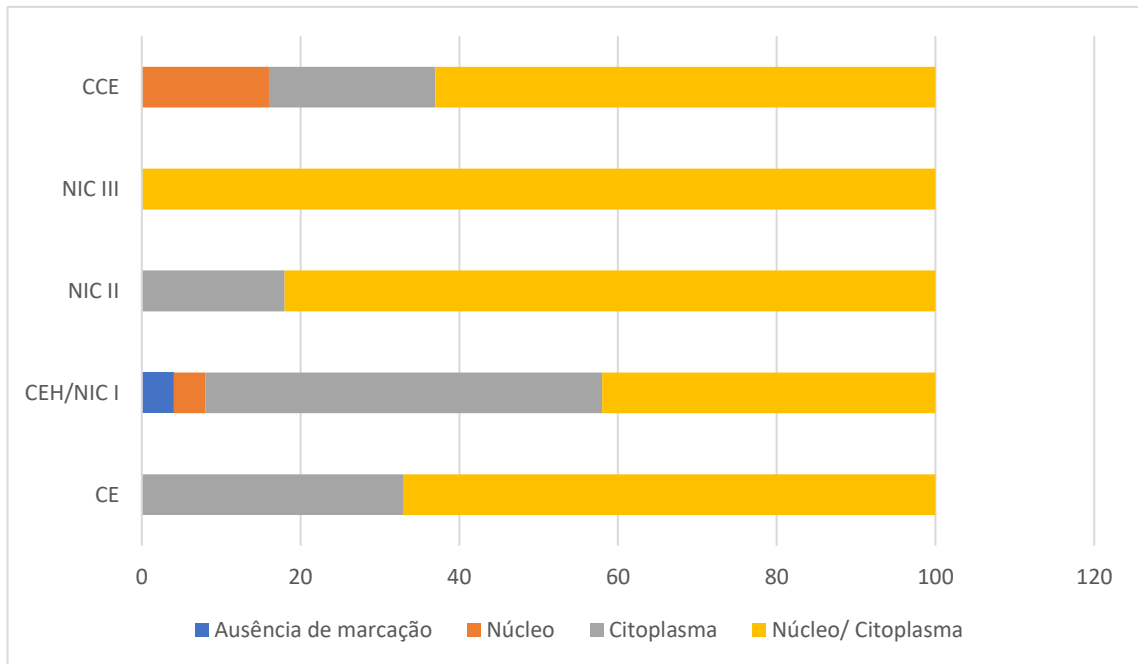


Figura 23 - Avaliação da localização celular por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais. CE: Cervicite crônica inespecífica; CEH/NIC I: Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV e Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1; NIC II: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 2; NIC III: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3; CCE: Carcinoma de Células Escamosas.* p valor: 0,008.

Observa-se com maior clareza, o predomínio da marcação concomitante do núcleo/citoplasma em todos os grupos avaliados. A fim de avaliar o parâmetro de Localização Celular com a progressão da lesão, construiu-se a **Figura 24**.

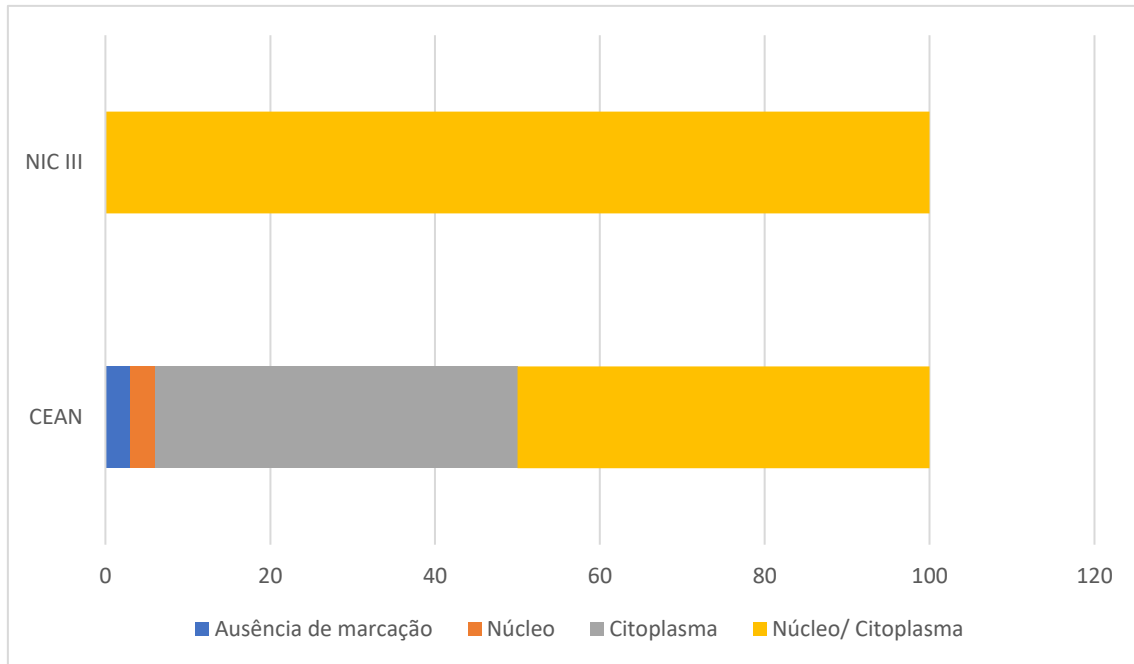


Figura 24 - Avaliação da localização celular por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais agrupadas conforme o risco da paciente evoluir para câncer. CEAN: Cervicite crônica inespecífica, Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV e Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1; NIC III: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3. * p valor: 0,004.

Observa-se pela análise da **Figura 24**, que a marcação simultânea de núcleo/citoplasma é predominante nos dois grupos analisados. No grupo de CEAN, em que há lesões de menor gravidade há um maior predomínio de marcação citoplasmática em comparação com o grupo III analisado, em que a marcação foi predominantemente núcleo/citoplasma. Na análise estatística, houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,004$).

Assim como para os parâmetros de Percentual de células reativas e Intensidade da marcação, as amostras de Carcinoma de Células Escamosas Pouco Diferenciado e Moderadamente Diferenciado foram investigadas segundo o parâmetro de Localização Celular da marcação (**Figura 25**).

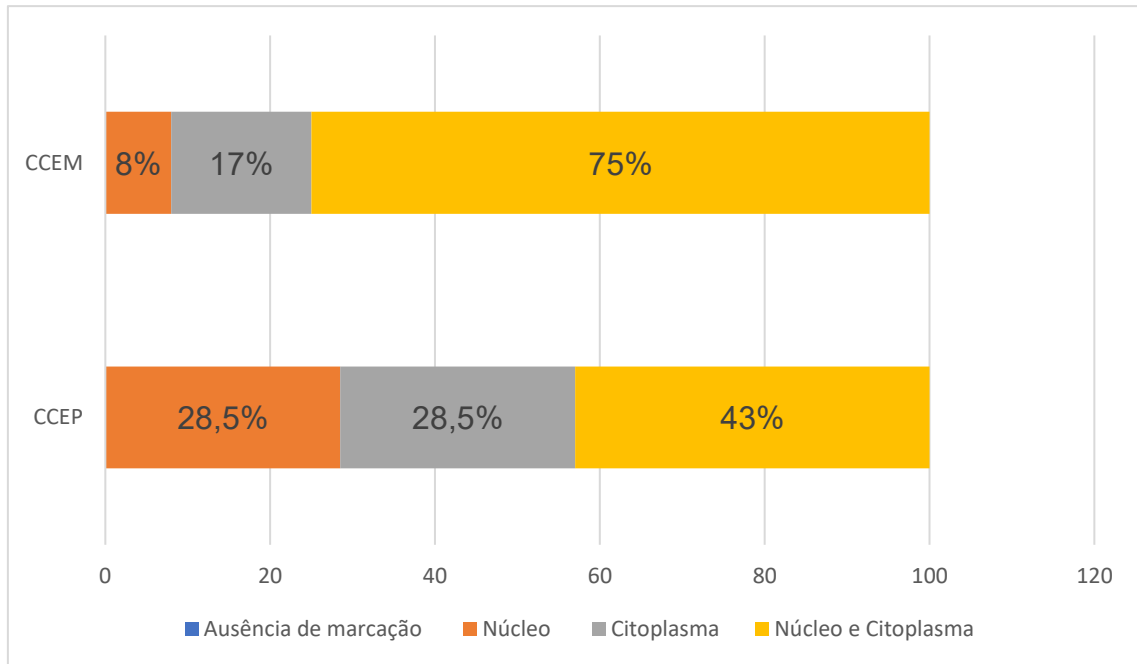


Figura 25 - Avaliação da localização celular por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 em amostras cervicais de CCE. CCEP: Carcinoma de Células Escamosas pouco diferenciado; CCEM: Carcinoma de Células Escamosas moderadamente diferenciado. * p valor: 0,124.

Pela análise da **Figura 25**, percebe-se que independente do grau de diferenciação do Carcinoma, há o predomínio de marcação nuclear/citoplasmática nos grupos CCEP (43%) e CCEM (75%). Entretanto, observa-se marcação nuclear e citoplasmática isolada no grupo de CCEP. Na análise estatística, não houve correlação significativa entre os grupos (p valor: 0,124).

6.5.2.5 – Avaliação da Imuno-histoquímica por RAP1 através do parâmetro Semi-quantitativo da Marcação nuclear em amostras cervicais

Os resultados obtidos estão descritos na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Avaliação Semi-quantitativa da Marcação nuclear por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais.

Nível	GRUPOS						Valor p
	CE	CEH/NIC I	NIC II	NIC III	CCE	TOTAL	
	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	
Marcação Nuclear							
Ausente	4 (17) (33)	13 (54) (54)	3 (12) (18)	- (-) (-)	4 (17) (21)	24 (100) (26)	
Uma cruz	6 (17) (50)	8 (23) (33)	11 (31) (65)	6 (17) (33)	4 (12) (21)	35 (100) (39)	
Duas cruzes	2 (13) (17)	1 (7) (4)	2 (13) (12)	4 (27) (22)	6 (40) (32)	15 (100) (17)	
Três cruzes	- (-) (-)	2 (13) (8)	1 (6) (6)	8 (50) (45)	5 (31) (26)	16 (100) (18)	
Total	12 (13) (100)	24 (27) (100)	17 (19) (100)	18 (20) (100)	19 (21) (100)	90 (100) (100)	<0,001

CE: Cervicite crônica inespecífica; CEH/NIC I: Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV e Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1; NIC II: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 2; NIC III: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3; CCE: Carcinoma de Células Escamosas.

Na avaliação Semi-quantitativa da Marcação nuclear de RAP1 pela Imuno-histoquímica observou-se que em lesões mais graves (NIC III e CCE) os núcleos marcados apresentam maior índice de positividade (níveis “três cruzes” e “duas cruzes”). Em relação a lesões menos graves observa-se predominância da marcação nuclear em níveis mais baixos (**Tabela 10**). Na análise estatística houve diferença estatística (p valor: <0,001). Para a melhor visualização desse parâmetro, foi criada a **Figura 26**.

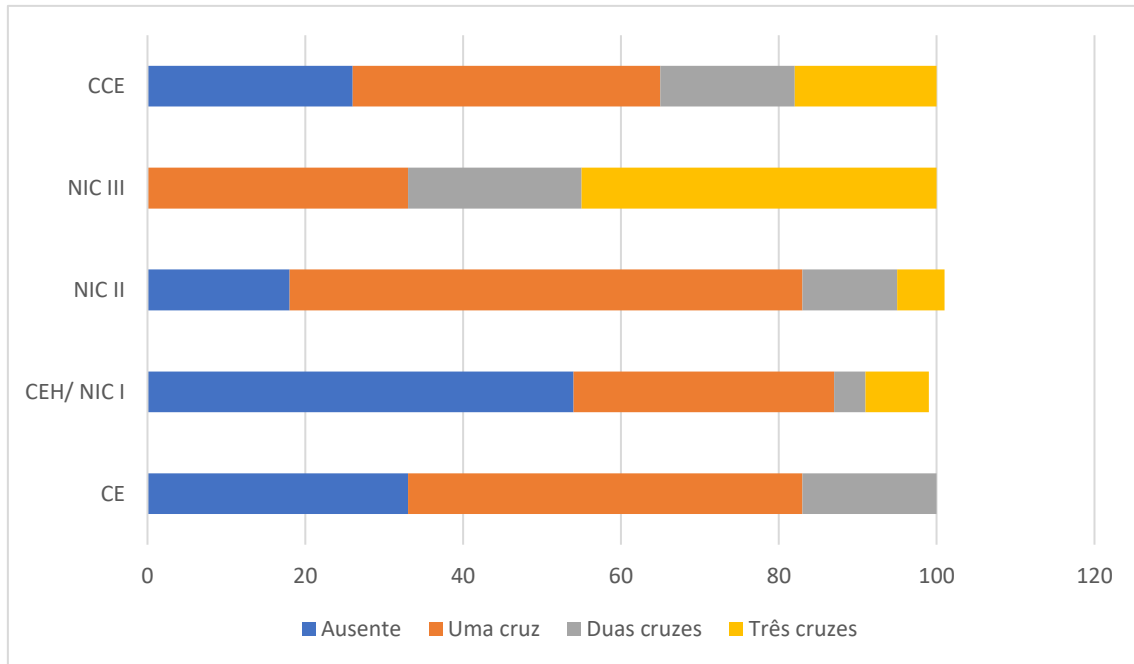


Figura 26 - Avaliação Semi-quantitativa da marcação nuclear por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais. CE: Cervicite crônica inespecífica; CEH/NIC I: Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV e Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1; NIC II: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 2; NIC III: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3; CCE: Carcinoma de Células Escamosas. p valor: <0,001.

Percebe-se pela análise da **Figura 26**, que a ausência de núcleos marcados é um aspecto presente em todos os grupos e, com o agravamento da lesão, a tendência para marcação nuclear se eleva.

Ao agruparmos CE com CEH/NIC I construiu-se a **Figura 27**.

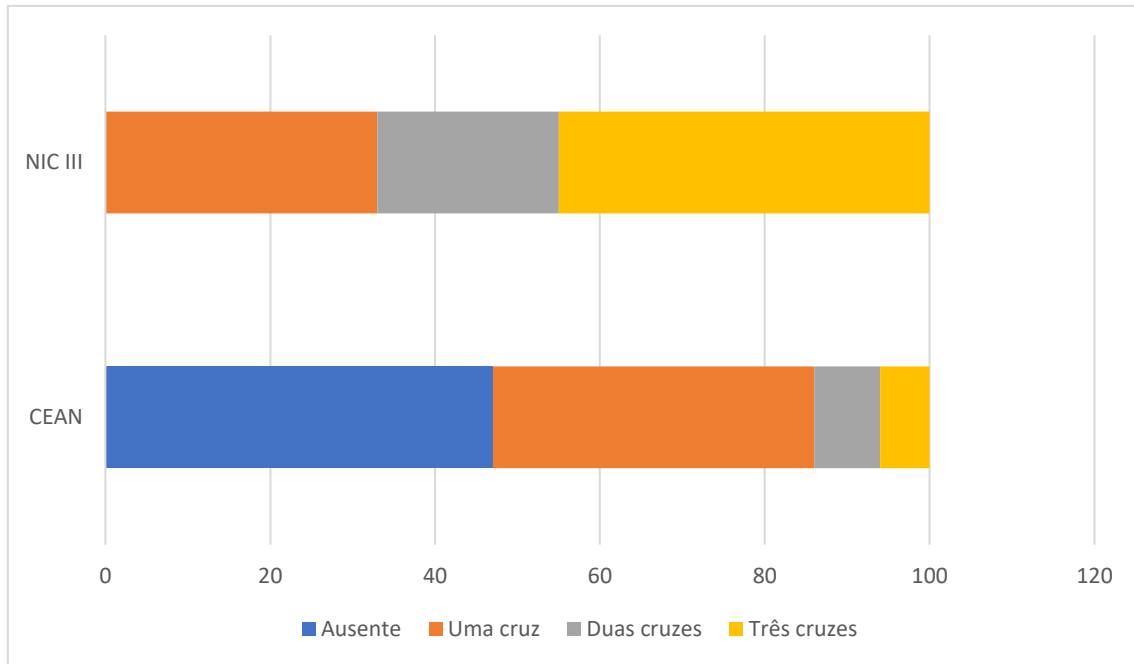


Figura 27 - Avaliação Semi-quantitativa da marcação nuclear por Imunohistoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais agrupadas conforme o risco da paciente evoluir para câncer. CEAN: Cervicite crônica inespecífica, Cervicite com alterações citoarquiteturais compatíveis com ação viral do HPV e Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1; NIC III: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3. * p valor: <0,001.

Percebe-se com a **Figura 27** que no grupo CEAN há o predomínio de amostras com ausência de marcação nuclear, grupo no qual há amostras de lesões menos graves. Já no grupo NIC III há o predomínio de amostras elencadas no nível “três cruces” representando 45%, do total de todas amostras deste grupo.

Para avaliar segundo o parâmetro considerado, as amostras de Carcinoma de Células Escamosas pouco diferenciados e moderadamente, construiu-se a **Figura 28**.

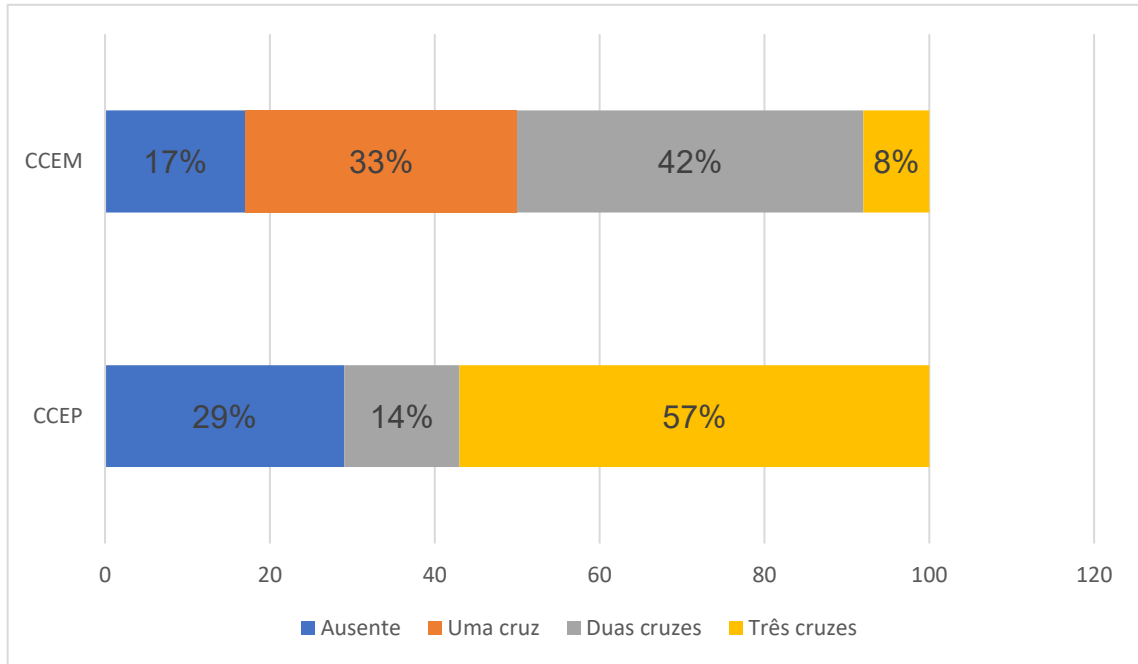


Figura 28- Avaliação Semi-quantitativa da marcação nuclear por Imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras cervicais de CCE. CCEP: Carcinoma de Células Escamosas pouco diferenciado; CCEM: Carcinoma de Células Escamosas moderadamente diferenciado. * p valor: 0,053.

No grupo de CCEP a maior proporção de núcleos marcados na Imuno-histoquímica pelo RAP1 está no nível “três cruces” (57%). Já no grupo de CCEM a maior proporção de núcleos marcados por este parâmetro está no nível “duas cruces” (42%). Apesar dessa diferença, não há relevância significativa ($p=0,053$).

7 – DISCUSSÃO

Na literatura, é extensivamente descrita a ação do HPV no desenvolvimento de lesões no colo uterino. Nos casos de câncer, o HPV está presente em cerca de 99% das amostras (WALBOOMERS *et al.*, 1999; BURD, 2003; TULAY & SERAKINCI, 2016). Neste presente estudo a detecção do DNA-HPV esteve presente em 72 amostras (73,74%). Essa taxa de detecção do HPV foi maior em relação a outros estudos em que também se utilizou amostras parafinadas e *Nested-PCR* como metodologia de detecção (LOBATO, 2011; PRAKASH *et al.*, 2016).

No grupo de CCE, a positividade para o DNA-HPV foi de 94,44%, com apenas uma amostra negativa, abaixo do percentual encontrado na literatura. A negatividade da infecção pelo HPV, não só nas amostras de carcinoma, mas também em todas as amostras de lesões neoplásicas analisadas, pode estar associada à estrita ligação existente entre detecção do HPV e qualidade da amostra. As amostras de FFPE possuem limitações em biologia molecular, sua fixação em formaldeído leva à degradação e modificação química dos ácidos nucléicos (MASUDA *et al.*, 1999; VON AHLFEN *et al.* 2007; SEILER *et al.*, 2016). Esta degradação dificulta o uso da PCR, limitando a análise do DNA por redução da quantidade e tamanho dos produtos amplificados (LEHMANN & KREIPE, 2001; DIETRICH *et al.*, 2013; ALVAREZ-ALDANA *et al.* 2015; SEILER *et al.*, 2016). Além disso, a presença da sequência alvo do *Primer* pode sofrer alteração ou perda, devido a possível integração do genoma viral com o genoma do hospedeiro (BURD, 2003). No estudo de Alvarez-Aldana e colaboradores (2015), relataram que a detecção do genoma do HPV através da amplificação por PCR de um gene humano não reflete, necessariamente, ao sucesso da extração do DNA viral e, que a fragmentação do DNA é um dos principais fatores que limitam o processo de detecção do DNA nessas amostras

Já no grupo de CE, apesar de não apresentar alterações citoarquiteturais compatíveis com a ação viral do HPV, houve a presença do genoma viral em 23% das amostras. Dado mais elevado ao encontrado na literatura em que a prevalência mundial de HPV em mulheres sem anormalidades citológicas é de aproximadamente 10% (BRUNI *et al.*, 2010; FORMAN *et al.* 2012). É sabido que os dados de prevalência variam enormemente de acordo com a população estudada, método de coleta e de diagnóstico utilizado, o que pode explicar tal variação. A escassez de dados sócio

epidemiológicos como idade, etnia, nível de desenvolvimento e acesso à saúde também dificultou a interpretação deste dado (BALOCH *et al.*, 2017).

Na análise dos índices de positividade para o DNA-HPV, observa-se que o aumento do percentual de detecção foi proporcional à progressão da neoplasia. Dado consistente com o trabalho de revisão sistemática de Bzhalava e colaboradores (2013) em que a prevalência geral do HPV aumentou de 13% na citologia normal para 89,5% na CCE. No trabalho Zhang L. e colaboradores (2017), o mesmo também foi observado: a detecção do DNA-HPV aumentou com o agravamento da lesão cervical (72.4% - NIC I, 81.4% - NIC II, 88.1% NIC III e 90.4% CCE). É possível inferir que o aumento do índice de positividade para o DNA-HPV, que ocorre com o agravamento das lesões cervicais, esteja relacionado com a presença de cargas virais mais elevadas já que alguns estudos apontam a existência de tal correlação (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, *et al.* 2003; MOBERG *et al.* 2005; MA, *et al.*, 2012; SHEN *et al.*, 2014). Entretanto, outros estudos não encontraram esta associação (SHERMAN *et al.*, 2002; ANDERSSON *et al.*, 2005). No estudo desenvolvido por Dong e colaboradores (2018) demonstrou que a correlação entre carga viral e severidade da lesão é dependente do tipo viral de HPV. Para os HPVs 16, 31, 33, 52 e 58 as cargas virais elevaram-se linearmente à medida que a gravidade citológica cervical também aumentou. Por outro lado, as cargas virais dos HPVs 18, 45, 56, 59 não se correlacionaram com a gravidade da lesão cervical.

Em relação ao Sequenciamento Automático de DNA realizado, das 72 amostras positivas para o HPV, 10 não puderam ser sequenciadas, por motivos variados. Essas amostras não sequenciadas pertenciam aos grupos de: CE (1), CEH (2), NIC I (3), NIC II (2), NIC III (1), CCE (1). Os genótipos encontrados no presente trabalho foram os de alto risco dos HPVs 16 (75,81%), 31 (6,45%), 33 (4,84%), 45 (3,23%), 53 (1,61%), 35 (1,61%), 52 (1,61%), 58 (1,61%) e 18 (1,61%) e um de possível risco carcinogênico: 70 (1,61%). É importante lembrar que a prevalência dos tipos de HPV diferem de acordo com a origem geográfica da população estudada (HUSAIN & RAMAKRISHNAN, 2015). No Brasil, pelo estudo de revisão de Sepúlveda-arias & Álvarez-aldana (2013), os quatro tipos virais de alto risco mais prevalentes em amostras cervicais são dos HPVs 16, 18, 33 e 58. Dado que condiz em parte com o achado do presente trabalho, em que os quatro tipos de HPVs mais prevalentes foram os HPVs 16 (75,81%), 31 (6,45%), 33 (4,84%), 45 (3,23%), em destaque para a alta prevalência do genótipo HPV16.

Em um outro estudo brasileiro realizado pelos pesquisadores De Oliveira e colaboradores (2013), os genótipos mais prevalentes em amostras de CCE, foram os HPVs 16 (77,6%), 18 (12,3%), 35 (5,9%), 31 (8,8%) e 33 (7,1%). Já em nível mundial, os genótipos mais comuns detectados no CCE são os HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58, sendo que os genótipos 16 e 18 representam a maioria, cerca de 50% e 20%, respectivamente (NI *et al.*, 2011; MATSUMOTO *et al.*, 2011; GHITTONI *et al.*, 2015; SAH *et al.*, 2018). No presente trabalho, o genótipo do HPV16 representou 87,50% das amostras do grupo de CCE seguido pelos genótipos 45 (6,25%) e 52 (6,25%). Somente uma amostra do grupo de NICII/III teve a presença do HPV18. Um estudo de De Sanjosé e colaboradores (2010) mostrou que o HPV 16 é o mais prevalente em Carcinomas escamosos, já o HPV18 é o mais prevalente em carcinomas adenoescamosos.

A prevalência do HPV16 em lesões mais graves já foi demonstrada por estudos prévios, em que mostraram associação deste genótipo com o risco aumentado de progressão neoplásica, sendo o tipo viral mais oncogênico (GHITTONI *et al.*, 2015; SCHIFFMAN *et al.*, 2015; LIE *et al.*, 2018, PARK *et al.*, 2019). Já o genótipo HPV45, apesar de ser mais comum no Adenocarcinoma do que no Carcinoma espinocelular, constitui cerca de 5% de todas as neoplasias cervicais do mundo (CHEN *et al.*, 2014). O HPV70, também isolado neste trabalho, é considerado de potencial risco carcinogênico, entretanto os estudos sobre esse genótipo ainda são limitados (SAINEL *et al.*, 2018). Um estudo realizado por Kim e colaboradores (2014) descobriu alta prevalência de HPV70 em casos de LSIL, sugerindo sua potencial associação em lesões pré-cancerosas.

Já nas duas amostras sequenciadas do grupo CE, observamos o predomínio do HPV16, apesar do pequeno número amostral. Segundo Bruni e colaboradores (2010) os genótipos dos HPVs 16, 18, 52, 58, 31 estão entre os mais frequentemente detectados em mulheres com citologia cervical sem atipias malignas.

Em relação aos dados da expressão de RAP1 nas amostras cervicais por Imuno-histoquímica, vários marcadores são estudados a fim de se obter especificidade na marcação de células neoplásica, tanto em biópsias quanto em esfregaços citológicos (KEATING *et al.*, 2001; GRAFLUND *et al.*, 2004; LOBATO, 2011; PASCOAL-XAVIER, 2011; DAS *et al.*, 2018). No presente estudo, avaliou-se a Imunomarcação de RAP1 em diferentes grupos histopatológicos de biópsias do colo

uterino. Para tal objetivo, realizou-se a Imuno-histoquímica de 90 amostras dessas referidas biópsias, do total de 101, como descrito na **Tabela 3** do item 6.5.1.

A impossibilidade da avaliação da marcação de RAP1 em onze amostras deveu-se à qualidade do processamento do tecido biopsiado. Os motivos que interferiram na análise por Imuno-histoquímica foram relacionados com a **(i)** à etapa de fixação dos tecidos antes de sua inclusão em parafina, que afetaram sua aderência nas lâminas sinalizadas; e **(ii)** à presença de autólise tecidual. A influência adversa e variável da fixação tecidual em formalina resulta em um fator intrínseco importante e incontornável (SHI, *et al.*, 2011). Para uma fixação ideal é importante avaliar o tipo de fixador utilizado, o seu tamponamento em pH ideal e o tempo de permanência no agente fixador (RAMOS-VARA, 2005). Alterações e/ou erros ocorridos nessas etapas, podem dificultar as análises Imuno-histoquímicas posteriormente realizadas.

No estudo de revisão de O'Hurley e colaboradores (2014) discutiu-se os desafios técnicos enfrentados pelo uso de biomarcadores Imuno-histoquímicos. Dentre os fatores que podem afetar o resultado da Imuno-histoquímica incluem o manuseio e o armazenamento de tecidos, a recuperação de epítomos, a escolha de anticorpos, os métodos de detecção e o procedimento de interpretação. No trabalho de Cheung e colaboradores (2014) destaca-se a importância da adequada preparação das amostras teciduais para ensaios Imuno-histoquímicos, devido à crescente importância dos testes preditivos e de prognósticos, na medicina personalizada.

Na literatura, a atuação de RAP1 é extensivamente estudada em processos patológicos neoplásicos (BAILEY *et al.*, 2009; van STAVEREN *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2018). Na Carcinogênese cervical, estudos relatam o envolvimento de RAP1 com oncoproteínas virais do HPV. Na transformação celular, é descrito que a degradação do E6TP1 pelo HPV-E6 oncogênico via ubiquitina ligase E6AP leva a maior ativação da RAP1, e à transformação celular (GAO *et al.*, 2002; SINGH *et al.*, 2003). Em um estudo realizado por Farina e colaboradores (2004), demonstrou-se que a ativação de RAP1 se correlaciona com a proteína E2 do HPV. Por meio da interação com a proteína nuclear Brd4, a proteína E2 pode ligar-se ao DNA episossomal viral ao genoma do hospedeiro. Brd4 é uma proteína nuclear que atua ligando-se à cromatina e, dessa forma regula a progressão do ciclo celular. Essa proteína interage também com uma RAPGAP denominada SPA-1, intensificando sua atividade inibidora de RAP1. Quando a proteína E2 liga-se à Brd4, compete com a proteína SPA-1. O que pode favorecer disfunção da proteína SPA1, criando um estado hiperativo de RAP1 no citoplasma.

Neste estudo, a marcação de RAP1 esteve presente em todos os grupos analisados, naqueles com e sem células neoplásicas. No trabalho de Pascoal-Xavier e colaboradores (2015), a proteína RAP1 foi indetectável em 36,4% das amostras não displásicas (12/33) e, quando esteve presente neste grupo, a imunocoloração de RAP1 foi pouco intensa. Observou-se neste trabalho que no grupo de cervicite, a marcação de RAP1 esteve presente nas 12 amostras avaliadas, e a intensidade da reação esteve distribuída nos níveis médio, forte e fraco, com as respectivas proporções 58%, 25% e 17%.

Assim, é sugestivo o papel dessa proteína no processo inflamatório. Achado esse condizente ao estudo de Figueiredo e colaboradores (2015), que ao avaliar a expressão de RAP1 pela técnica Imunocitoquímica em um grupo de amostras com alterações celulares benignos, houve a hiperexpressão da proteína RAP1 o que sugere a associação dessa proteína com a atividade inflamatória.

Os parâmetros de distribuição de células reativas na espessura do epitélio e percentual de células reativas foram utilizados como controle de qualidade da reação imuno-histoquímica. É sabido que, nas lesões NIC I, as células neoplásicas se concentram no terço basal do epitélio, em NIC II, elas ocupam dois terços desse tecido e em NIC III, as células neoplásicas são encontradas em toda a extensão tecidual. Isto foi claramente observado nos testes realizados, com $p < 0,001$. Ou seja, a marcação com RAP1 permitiu localizar as células neoplásicas e esta estava coerente com a história natural da doença relatada na literatura. Este parâmetro também foi importante pois permitiu a identificação da área da lesão a ser analisada para os demais parâmetros. Vale ressaltar, o comportamento da distribuição da marcação nas amostras de cervicite. Neste grupo, em que há ausência de neoplasia, vemos que este parâmetro se comportou de forma heterogênea. Das amostras de CE analisadas, 33% foram categorizadas no nível 1, marcação do terço basal do epitélio; 25% no nível 2, dois terços e 42% no nível 3, toda espessura do epitélio. Esse dado é discrepante ao encontrado na literatura, em que células não displásicas apresentam distribuição ausente (36%) ou então restrita ao terço basal (64%) (PASCOAL-XAVIER, 2011).

Quanto ao percentual de células reativas, este parâmetro foi útil para avaliar a qualidade da marcação por RAP1. A literatura relata que a expressão de RAP1 encontra-se aumentada nas células neoplásicas. Apesar de não ter encontrado diferença estatística ($p=0,105$), o percentual de marcação mostrou-se maior nas lesões intraepiteliais mais graves, onde 100% das amostras de NIC III tiveram um percentual de marcação difusa ($>50\%$), enquanto que nas alterações consideradas mais leves (CEAN), 72% obteve esse tipo de marcação. Ao analisar as amostras em seus diferentes grupos, o p encontrado foi de 0,04. Apesar de p significativo, a maioria das amostras (71/90, 79%), independente do grau de lesão, foi classificada no mesmo nível (nível 3, $> 50\%$ de marcação) e não foi vista uma evolução no aumento do percentual de células marcadas com o agravamento da lesão. Já no trabalho de Pascoal-Xavier (2011), ao avaliar este parâmetro, os grupos com amostras cervicais de mucosa não displásica e NIC I foram elencadas em sua maioria no nível focal 2 (5 a 25% de marcação). Ao se analisar este parâmetro nas amostras de CCE, observa-se que a maioria destas lesões (17/19) apresentam nível 2 e 3 de reatividade, sendo por isso, este parâmetro considerado um bom marcador para lesões invasivas. Entretanto, este parâmetro não foi capaz de identificar e separar os diferentes tipos de cânceres.

Os parâmetros: Intensidade da reação, Localização celular da marcação e Semi-quantificação da marcação nuclear foram utilizados na avaliação de RAP1 como biomarcador.

Pelo parâmetro de intensidade da marcação, observou-se elevados níveis de intensidade em lesões teciduais mais graves. A maioria das amostras de CE (9/12, 75%), CEH+NIC I (19/24, 79%) e NIC II (14/17, 82%) foram categorizadas nos níveis 1 e 2 (fraco e médio, respectivamente), enquanto que a maioria das amostras de NIC III (11/18, 61%) e CCE (12/19, 63%) foram categorizadas no nível 3 (forte). Ao reagrupar as amostras separando as lesões mais leves (CE, CEH e NIC I) de lesões mais graves (NIC III), observa-se uma evolução no aumento da intensidade da marcação com o agravamento da lesão. Valores de p significativos foram encontrados (0,013 e 0,017), demonstrando ser esse um bom parâmetro para a identificação de lesões mais graves. Este achado é semelhante aos de Pascoal-Xavier (2015), onde observou-se um aumento gradual da expressão de RAP1 das amostras controle para as de NIC I e NIC II/III.

Na análise dos diferentes tipos de CCE, percebe-se que, independente do tipo de tumor, a marcação é predominantemente intensa (nível 3, 58% CCEM e 70%

CCEP), sendo, por isso, RAP1 um bom marcador para lesões invasivas, mas não útil na diferenciação dos tipos ($p=0,828$).

Pelo parâmetro Imuno-histoquímico para localização celular de RAP1 houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p= 0,008$), com o predomínio de marcação nuclear/citoplasmática (69%). Pode-se perceber que com o agravamento da lesão, extenuando-se CCE, há o aumento da porcentagem de marcação nuclear/citoplasmática. O que fica evidente ao unir lesões leves (grupo CEAN) e compará-las a lesões mais graves (grupo NIC III) ($p=0,004$). Analisando o grau de diferenciação das amostras de CCE, percebe-se que não houve diferença significativa na localização celular da marcação ($p= 0,124$), entretanto, observa-se que o grupo CCEP há maior quantidade de amostras elencadas na localização nuclear (28,5%) quando comparado ao CCEM (8%). Estes dados fortalecem a hipótese de migração nuclear nos processos neoplásicos e se mostrou um bom marcador para a identificação de lesões graves.

Ao avaliar de forma semi-quantitativa a quantidade de núcleos marcados, percebe-se que nas lesões mais graves, CCE e NIC III, a marcação de duas e três cruzes foi a mais frequente com, respectivamente, 32% e 45% das amostras. Em NIC II, a maioria das amostras (65%) foi categorizada com uma cruz e a maioria das amostras de NIC I + CEH (54%) e CE (33%), não possuíam marcação nuclear. Um valor significativo de p foi encontrado ($< 0,001$). Ao agrupar CE, CEH e NIC I (CEAN) e compará-las à NIC III, percebe-se que RAP1 foi útil na identificação das lesões mais graves, com valor de $p < 0,001$. A marcação nuclear mostrou-se um bom marcador de lesões graves. Ao comparar os diferentes tipos de carcinoma a marcação nuclear, novamente, se mostrou maior no CCEP (57%) quando comparado ao CCEM (8%), com valor de p de $< 0,001$.

A literatura relata uma tendência da translocação de RAP1 para o núcleo de acordo com o agravamento da lesão, o que também foi observado neste trabalho. Isso também reforça o aumento da atividade de RAP1 em processos malignos (MITRA *et al.*, 2003; PASCOAL-XAVIER *et al.*, 2015).

8- CONCLUSÕES

Diante dos resultados do presente estudo, foi possível concluir que:

- Células epiteliais de tecido cervical uterino expressam a proteína RAP1 com predomínio da Imuno-marcação nuclear e citoplasmática.
- A expressão da proteína RAP1 parece estar associada a alterações celulares benignas como a presença de inflamação.
- Houve correlação significativa, nos parâmetros de Intensidade, Localização da marcação celular e da Semi-quantificação nuclear da expressão de RAP1 como biomarcador tumoral.

9- PERSPECTIVAS

- Ampliar o “n amostral” de todos os grupos utilizados no presente estudo;
- Compreender a participação de RAP1 em processos inflamatórios;
- Correlacionar, por outros parâmetros Imuno-histoquímicos, a expressão de RAP1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDÉ, S.; ALMEIDA, G.; VAL, I.; JUNIOR, N. V.; CAMPANER, A. B. **DST - J bras Doenças Sex Transm** v. 21, n. 4, p. 166-170, 2009.

AGOFF, S. N.; LIN, P.; MORIHARA, J.; MAO, C.; KIVIAT, N. B.; KOUTSKY, L.A. p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. **Mod Pathol.** v. 16, n. 7, p. 665-73, 2003.

AHMED, S. A.; OBASEKI, D. E.; MAYUN, A. A.; MOHAMMED, A.; RAFINDADI, A. H.; ABDUL, M. A. The role of biomarkers (p16INK4a and Ki-67) in cervical cancer screening: An appraisal. **Ann Trop Pathol.** v. 8, p. 1-4, 2017.

AKAGI, K.; LI, J.; BROUTIAN, T.R.; PADILLA-NASH, H.; XIAO, W.; JIANG, B.; ROCCO, J.W.; TEKNOS, T.N.; KUMAR,B.; WANGSA, D.; HE, D.; RIED, T.; SYMER, D.E.; GILLISON, M.L. Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. **Genome Research.** v. 24, n. 2, p. 185-99, 2014.

ALLEN, K.; HOLLADAY, E. B. **Risk Management for the Cytology Laboratory.** 1. ed. Raleigh, NC: American Society for Cytotechnology, 2002.

ALVAREZ-ALDANA, A.; MARTÍNEZ, J. W.; SEPÚLVEDA-ARIAS, J.C. Comparison of five protocols to extract DNA from paraffin-embedded tissues for the detection of human papillomavirus. **Pathol Res Pract.** v. 211, n. 2, p. 150-5, 2015.

ANATOMIA PATOLÓGICA UNICAMP. **Neoplasia Intraepitelial cervical.**

Disponível em: < <http://anatpat.unicamp.br/lamgin2.html> >. Acesso em 04 de Setembro de 2019.

ANDERSSON, S.; SAFARI, H.; MINTS, M.; LEWENSOHN-FUCHS, I.; GYLLENSTEN, U.; JOHANSSON, B. Type distribution, viral load and integration

status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). **Br J Cancer**. v. 92, p. 2195–200, 2005.

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

ARCARO, F.; MACHADO, N. A.; DUARTE, P. S.; HAAS, P. Comparação dos resultados de exames preventivos e de rastreamento de câncer de colo do útero em mulheres brasileiras. **Rev Inst Adolfo Lutz**. v. 69, n. 1, p. 119-125, 2010.

ARISTA, A.; MURTIASUTIK, D.; SETYANINGRUM, T.; MASTUTIK, G. Genotyping of Human Papilloma Virus (HPV) in female condyloma acuminata patient in Dr. Soetomo Hospital. **Dermatology Reports**. v. 11, n. s1:8062, p. 122 - 123, 2019.

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

AZIZMOHAMMADI, S.; SAFARI, A.; AZIZMOHAMMADI, S.; KAGHAZIAN, M.; SADRKHANLO, M.; YAHAGHI, E.; FARSHGAR, R.; GUNASEKHARAN, V.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses modulate microRNA 145 expression to directly control genome amplification. **J Virol**. v. 87, n. 10, p. 6037–6043, 2013.

BAILEY, C. L.; KELLY, P.; CASEY, P. J. Activation of Rap1 promotes prostate cancer metastasis. **Cancer research**. v. 69, n. 12, p. 4962–4968, 2009.

BALL, S. L.; WINDER, D. M.; VAUGHAN, K.; HANNA, N.; LEVY, J.; STERLING, J. C.; STANLEY, M. A.; GOON, P. K. Analyses of human papillomavirus genotypes and viral loads in anogenital warts. **J Med Virol** v. 83, n. 8, p. 1345-1350, 2011.

BALOGH, Z.; YASMEEN, N.; LI, Y.; MA, K.; WU, X.; YANG, S-H.;XIA, X. Prevalence and risk factors for human papillomavirus infection among Chinese ethnic women in southern of Yunnan, China. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 21, n. 3, p. 325-332, 2017.

BANERJEE, R.; HENSON, B. S.; RUSSO, N.; TSODIKOV, A.; D'SILVA, N. J. Rap1 mediates galanin receptor 2-induced proliferation and survival in squamous cell carcinoma. **Cellular signaling**. v. 23, n. 7, p. 1110–1118, 2011.

BEN, W.; YANG, Y.; YUAN, J.; SUN, J.; HUANG, M.; ZHANG, D.; ZHENG, J. Human papillomavirus 16 E6 modulates the expression of host microRNAs in cervical cancer. **Taiwanese journal of obstetrics & gynecology**. v. 54, n. 4, p. 364–370, 2015.

BERGER, G.; QUARCK, R.; TENZA, D.; LEVY-TOLEDANO, S.; DE GUNZBURG, J.; CRAMER, E. M. Ultrastructural localization of the small GTP-binding protein Rap1 in human platelets and megakaryocytes. **Br J Haematol**. v. 88, n. 2, p. 372-82, 1994.

BERNARD, H-U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **Journal of Clinical Virology**. v. 32S, p. S1-S6, 2005.

BERMUDEZ, A.; BHATLA, N.; LEUNG, E. Cancer of the cervix uteri. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**. v. 131, n. 2, p, S88–S95, 2015.

BIVONA, T. G.; WIENER, H. H.; AHEARN, I. M.; SILLETTI, J.; CHIU, V. K.; PHILIPS, M. R. Rap1 up-regulation and activation on plasma membrane regulates T cell adhesion. **The Journal of cell biology**. v. 164, n. 3, p. 461–470, 2004.

BOETTNER, B.; AELST, L. V. Control of cell adhesion dynamics by Rap1 signaling. **Current opinion in cell biology**. v. 21, n. 5, p. 684–693, 2009.

BOS, J. L. Linking Rap to cell adhesion. **Curr Opin Cell Biol**. v. 17, n. 2, p. 123-8, 2005.

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

BRANHAM, M.T.; BUSTOS, M.A.; DE BLAS, G.A.; REHMANN, H.; ZARELLI, V.E.; TREVINO, C. L.; DARSZON, A.; MAYORGA, L.S.; TOMES, C.N. Epac activates the small g proteins rap1 and rab3a to achieve exocytosis. **J Biol Chem** v.284, n. 37, p. 24825-24839, 2009.

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

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

BRUNI, L.; ALBERO, G.; SERRANO, B.; MENA, M.; GÓMEZ, D.; MUÑOZ, J.; BOSCH, F.X.; DE SANJOSÉ, S. Human Papilloma virus and Related Diseases in the World. **ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre)**. v. 22, p. 1-316, 2019.

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

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

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

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

CAI, Y.; SUKHOVA, G. K.; WONG, H. K.; XU, A.; TERGAONKAR, V.; VANHOUTTE, P. M.; TANG, E. H. Rap1 induces cytokine production in pro-inflammatory macrophages through NFκB signaling and is highly expressed in human atherosclerotic lesions. **Cell Cycle**. v. 14, n. 22, p. 3580-92, 2015.

CAMARA, G. N. N. L.; CRUZ, M. R.; VERAS, V. S.; MARTINS, C. R. F. Os papilomavírus humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. **Universitas Ciências da Saúde**. v. 01, n. 01, p. 149-158, 2008.

CAREY, K. D.; STORK, P. J.S. Nonisotopic Methods for Detecting Activation of Small G Proteins. **Methods in Enzymology**. v. 345, p. 383-397, 2002.

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

CASTLE, P.E.; SCHIFFMAN, M.; WHEELER, C.M.; SOLOMON, D. Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia-grade 2. **Obstet Gynecol**. v. 113, n. 1, p. 18-25, 2009.

CASTRO, T. M. P. P. G.; FILHO, B. I. NASCIMENTO, V. X., XAVIER, S. D. HPV detection in the oral and genital mucosa of women with positive histopathological exam for genital HPV, by means of the PCR. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. v. 75, n. 2, p. 167-171, 2009.

CECCATO JUNIOR, B. P.; LOPES, A. P.; NASCIMENTO, L. F.; NOVAES, L. M.; MELO, V. H. Prevalência de infecção cervical por papilomavírus humano e neoplasia

Intraepitelial cervical em mulheres HIV-positivas e negativas. **Rev Bras Ginecol Obstet.** v. 37, n. 4, p. 178-85, 2015.

CHAN, P.K.; LUK, A.C.; LUK, T.N.; LEE, K.F.; CHEUNG, J.L.; HO, K.M.; LO, K.K. Distribution of human papillomavirus types in anogenital warts of men. **J Clin Virol.** v. 44, n. 2, p. 111-114, 2009.

CHEN, M. K.; HUNG, H. F.; DUFFY, S.; YEN, A. M.; CHEN, H. H. Cost-effectiveness analysis for Pap smear screening and human papillomavirus DNA testing and vaccination. **J Eval Clin Pract.** v. 17, n. 6, p. 1050-8, 2011.

CHEN, C. H.; CHUANG, H. C.; HUANG, C. C.; FANG, F. M.; HUANG, H. Y.; TSAI, H. T.; SU, L. J.; SHIU, L. Y.; LEU, S.; CHIEN, C. Y. Overexpression of rap-1a indicates a poor prognosis for oral cavity squamous cell carcinoma and promotes tumor cell invasion via aurora-a modulation. **Am J Pathol.** v.182, p. 516-528, 2013.

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

CHEUNG, C. C.; BANERJEE, D.; BARNES, P. J.; BERENDT, R. C.; BUTANY, J.; CANIL, S.; CLARKE, B. A.; EL-ZIMAITY, H.; GARRATT, J.; GELDENHUYS, L.; GILKS, C. B.; MANNING, L.; MENGEL, M.; PEREZ-ORDONEZ, B.; PILAVDZIC, D.; RIDDELL, R.; SWANSON, P. E.; TORLAKOVIC, E. E. **American Journal of Clinical Pathology.** v. 142, n. 5, p. 629–633, 2014.

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

CHOW, L. T.; BROKER, T.R.; STEINBERG, B.M. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica.** v. 118, p. 422–449, 2010.

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

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

CONSTANDINO-WILLIAMS, C.; COLLINS, S.; ROBERTS, S.; YOUNG, L. S.; WOODMAN, C.; MURRAY, P. G. Is Human Papillomavirus Viral Load a Clinically Useful Predictive Marker? A Longitudinal Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. v. 19, n. 3, p. 832-837, 2010.

CORTE, L. M. D.; GONSALVES, J. C.; SILVA, C. S.; DUTRA, M. F.; ROCHA, D. B.; UTIZG, C. B.; VALCHER, R. A.; LUCAS, C. A. P.; CORTE, E. A. D.; VARGAS, V. R. A. Análise da Concordância Interobservadores em Exames de Papanicolaou. **NewsLab**. v. 80 , p. 98- 106, 2007.

COX, J.T.; SCHIFFMAN, M.; SOLOMON, D. ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. **Am J Obstet Gynecol**. v. 188, p. 1406-1412, 2003.

CRAWFORD, L.V.; CRAWFORD, E.M. A comparative study of polyoma and papilloma viruses. **Virology**. v. 21, n. 2, p. 258-263, 1963.

CULLEN, A. P.; REID, R.; CAMPION, M.; LÖRINCZ, A. T. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. **J Virol**. v. 65, n. 2. p. 606-12, 1991.

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

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

DE OLIVEIRA, C. M.; FREGNANI, J. H.; CARVALHO, J. P.; LONGATTO-FILHO, A.; LEVI, J. E. Human papillomavirus genotypes distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil. **BMC cancer.** v. 13, n. 357, p. 1-8, 2013.

DE RODA HUSMAN, A. M.; WALBOOMERS, J. M.; VAN DEN BRULE, A. J.; MEIJER, C. J.; SNIJDERS, P. J. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **J Gen Virol.** v. 76, Pt 4, p. 1057-62, 1995.

DE SANJOSE, S.; QUINT, W. G.; ALEMANY, L.; GERAETS, D.T.; KLAUSTERMEIER, J. E.; LLOVERAS, B.; TOUS, S.; FELIX, A.; BRAVO, L. E.; SHIN, H. R.; VALLEJOS, C. S.; de RUIZ, P. A.; LIMA, M.A.; GUIMERA, N.; CLAVERO, O.; ALEJO, M.; LLOMBART-BOSCH, A.; CHENG-YANG, C.; TATTI, S. A.; KASAMATSU, E.; ILJAZOVIC, E.; ODIDA, M.; PRADO, R.; SEOUD, M.; GRCE, M.; USUBUTUN, A.; JAIN, A.; SUAREZ, G. A.; LOMBARDI, L. E.; BANJO, A.; MENÉNDEZ, C.; DOMINGO, E. J.; VELASCO, J.; NESSA, A.; CHICHAREON, S. C.; QIAO, Y. L.; LERMA, E.; GARLAND, S. M.; SASAGAWA, T.; FERRERA, A.; HAMMOUDA, D.; MARIANI, L.; PELAYO, A.; STEINER, I.; OLIVA, E.; MEIJER, C. J.; ALJASSAR, W. F.; CRUZ, E.; WRIGHT, T. C.; PURAS, A.; LLAVE, C. L.; TZARDI, M.; AGORASTOS, T.; GARCIA-BARRIOLA, V.; CLAVEL, C.; ORDI, J.; ANDÚJAR, M.; CASTELLSAGUÉ, X.; SÁNCHEZ, G. I.; NOWAKOWSKI, A. M.; BORNSTEIN, J.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **Lancet Oncology.** v.11, n.11, p.1048-1056, 2010.

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

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

DEL RÍO-OSPINA, L.; SOTO-DE LEÓN, S. C.; CAMARGO, M.; MORENO-PÉREZ, D. A.; SÁNCHEZ, R.; PÉREZ-PRADOS, A.; PATARROYO, M. E., PATARROYO, M. A. The DNA load of six high-risk human papillomavirus types and its association with cervical lesions. **BMC Cancer** v.15, n. 100, p. 1 -11, 2015.

DENNY, L.; PRENDIVILLE, W. Cancer of the cervix: Early Journal of Gynecology and Obstetrics. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**. v. 131, p. S28-S32, 2015.

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

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

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

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

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

DOORBAR, J. The papillomaviruses life cycle. **J Clin Virol**. v. 32, n. 1, p. 7- 15, 2005.

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

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

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

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

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

EKALAKSANANAN, T.; PIENTONG, C.; SRIAMPORN, S.; KONGYINGYONES, B.; PENGSA, P.; KLEEBKAOW, P.; KRITPETCHARAT, O.; PARKIN, D. M. Usefulness of combining testing for p16 protein and human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma screening. **Gynecol Oncol**. v. 103, n. 1, p. 62-6, 2006.

ELEUTÉRIO JUNIOR, J.; GIRALDO, P. C.; GONÇALVES, A. K. Marcadores imunohistoquímicos de lesões precursoras do câncer do colo uterino associadas ao HPV: o papel da proteína de supressão tumoral p16^{ink4a}. DST – **J Bras Doenças Sex Transm**. v 18, n. 1, p. 62-65, 2006.

ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. **Nat Rev Cancer**. v. 6, n. 4, p. 259-69, 2006.

FARINA, A.; HATTORI, M.; QIN, J.; NAKATANI, Y.; MINATO, N.; OZATO, K. Bromodomain protein Brd4 binds to GTPase-activating SPA-1, modulating its activity and subcellular localization. **Mol Cell Biol**. v. 24, n. 20, p. 9059-69, 2004.

FEDRIZZI, E. Clinical Manifestations of Genital HPV Infection. In: Broeck, D. V. **Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - A Clinical Perspective**. 1. ed. Rijeka: InTech, 2012. p. 83 – 98.

FERRAZ, L. C.; SANTOS, A. B. R.; DISCACCIATI, M. G. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia Intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. **Health Sci Inst**. v. 30, n.2, p. 107-111, 2012.

FERREIRA, H.; LALA, E. R. P.; MANSOUR, F. R. Frequência de Papilomavirus humano (HPV) em gestantes. **Perspectivas Online: Biológicas & Saúde**. v. 7, n. 25, p. 44-53, 2017.

FIGUEIREDO, A. C. C. **Caracterização Imunocitoquímica da expressão da proteína RAP1 em blocos de células escamosas provenientes de citologia cervical em meio líquido**. 2015. 141 f. Dissertação (Mestre em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte.

FISHER, C. Recent Insights into the Control of Human Papillomavirus (HPV) Genome Stability, Loss, and Degradation. **J. Clin. Med**. v. 4, p. 204-230; 2015.

FLORES, R.; PAPENFUSS M.; KLIMECKI, W. T.; GIULIANO, A. R. Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. **International Journal of Cancer**. v. 118, n. 5, p. 1187 – 1193, 2005.

FORMAN, D.; MARTEL, C.; LACEY, C. J.; SOERJOMATARAM, I.; LORTET-TIEULENT, J.; BRUNI, L.; VIGNAT, J.; FERLAY, J.; BRAY, F.; PLUMMER, M.; FRANCESCHI, S. Global burden of human papillomavirus and related diseases. **Vaccine**. v. 30, n. 5; p. 12-23, 2012. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.07.055.

FREEMAN, A.; MORRIS, L. S.; MILLS, A. D.; STOEBER, K.; LASKEY, R. A.; WILLIAMS, G. H.; COLEMAN, N. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. **Clin Cancer Res**. v. 5, n. 8, p. 2121-32, 1999.

FRISCHE, E.W.; ZWARTKRUIS, F.J.T. Rap1, a mercenary among the Ras-like GTPases. **Developmental Biology**. v. 340, n. 1, p. 1-9, 2010.

GAO, Q.; KUMAR, A.; SINGH, L.; HUIBREGTSE, J.M.; BEAUDENON, S.; SRINIVASAN, S.; WAZER, D.E.; BAND, H.; BAND, V. Human papillomavirus E6-induced degradation of E6TP1 is mediated by E6AP ubiquitin ligase. **Cancer Res**. v. 62, p. 3315-3321, 2002.

GAO, L.; FENG, Y.; BOWERS, R.; BECKER-HAPAK, M.; GARDNER, J.; COUNCIL, L.; LINETTE, G.; ZHAO, H.; CORNELIUS, L. A. Ras-associated protein-1 regulates extracellular signal-regulated kinase activation and migration in melanoma cells: two processes important to melanoma tumorigenesis and metastasis. **Cancer Res**. v. 66, n. 16, p. 7880-8, 2006.

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

GAO, W.; YE, G.; LIU, L.; WEI, L. The downregulation of Rap1 GTPase-activating protein is associated with a poor prognosis in colorectal cancer and may impact on tumor progression. **Oncology Letters**. v. 15, n. 5, p. 7661-7668, 2018.

GHITTONI, R.; ACCARDI, R.; CHIOCCA, S.; TOMMASINO, M. Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. **Ecancermedicalscience**. v. 9, 526, 2015.

GILBERT, M. T. P.; TAMARA, H.; MICHAEL, B.; SANCHEZ, J. J.; LUCAS, S. B.; JEWELL, L. D.; MARCK, E. V.; WOROBEY, M. The Isolation of Nucleic Acids from Fixed, Paraffin-Embedded Tissues—Which Methods Are Useful When? **PLOS ONE**. v. 2, n. 6, e537, 2007.

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

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

GLOERICH, M.; BOS, J. L. Regulating Rap small G-proteins in time and space. **Trends Cell Biol**. v. 21, n. 10, p. 615-623, 2011.

GOITRE, L.; TRAPANI, E.; TRABALZINI, L.; RETTA, S. F. The Ras Superfamily of Small GTPases: The Unlocked Secrets. **Methods in Molecular Biology**. v. 1120, p. 1-18, 2014.

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

GRAFLUND, M.; SORBE, B.; SIGURDARDOTTIR, S.; KARLSSON, M. G. Relation between HPV-DNA and expression of p53, bcl-2, p21WAF-1, MIB-1, HER-2/neu and DNA ploidy in early cervical carcinoma: correlation with clinical outcome. **Oncol Rep**. v. 12, n. 1, p. 169–176, 2004.

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

GRAVITT, P. E., & WINER, R. L. Natural History of HPV Infection across the Lifespan: Role of Viral Latency. **Viruses.** v. 9, n. 10, p. 267, 2017.

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

GRM, H. S.; BERGANT, M.; BANKS, L. Human papillomavirus infection, cancer & therapy. **Indian J Med Res.** v. 130, p 277-285, 2009.

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

GUIDETTI, G. F.; TORTI, M. The Small GTPase Rap1b: A Bidirectional Regulator of Platelet Adhesion Receptors. **Journal of signal transduction.** v. 2012: 412089, 2012.

GUO, X.-X.; AN, S. K.; YANG Y.; LIU, Y.; HAO, Q.; XU T.-R. Rap-Interacting Proteins are Key Players in the Rap Symphony Orchestra. **Cell Physiol Biochem.** v. 39, p. 137-156, 2016.

GYAN, E.; FREW, M.; BOWEN, D.; BELDJORD, C.; PREUDHOMME, C.; LACOMBE, C.; MAYEUX, P.; DREYFUS, F.; PORTEU, F.; FONTENAY, M. Mutation in RAP1 is a rare event in myelodysplastic syndromes. **Leukemia.** v. 19, n. 9, p. 1678-80, 2005.

HARLÉ, A.; GUILLET, J.; THOMAS, J.; SASTRE-GARAU, X.; ROUYER, M.; RAMACCI, C.; GILSON, P.; DUBOIS, C.; DOLIVET, G.; LEROUX, A.; SALLERON, J.; MERLIN J-L. Evaluation and validation of HPV real-time PCR assay for the detection of HPV DNA in oral cytobrush and FFPE samples. **Sci Rep.** v. 8, n. 11313, 2018.

HARMON, M. L.; KUMARASEN, C. Cervical neoplasia. In: NUCCI, M. R.; OLIVA E. **Gynecologic Pathology**. 1. ed. Boston: Elsevier Churchill Livingstone, 2009, p. 141-196.

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

HAUSEN, H. Z. Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 92, n. 9, 2000.

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

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, D. M.; ORNELAS-BERNAL, L.; GUIDO-JIMÉNEZ, M.; APRESA-GARCÍA, T.; ALVARADO-CABRERO, I.; SALCEDO-VARGAS, M.; MOHAR-BETANCOURT, A.; GARCÍA-CARRANCA, A. Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women. **Gynecologic Oncology**. v. 90, n. 2, p. 310-317, 2003.

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

HERNÁNDEZ-MONTES, J.; ROCHA-ZAVALA, L.; MONROY-GARCÍA, A.; WEISS-STEIDER, B.; ZARAGOZA, O. M. C.; CRUZ-TALONIA, F.; CRUZ Y CRUZ, O.; BONIFAZ-ALFONSO, L.; CHÁVEZ-RUEDA, A. K.; ROJO-AGUILAR, M. P.; LEGORRETA-HAQUET, M. V.; MORA-GARCÍA, M. L. Peripheral blood lymphocytes from low-grade squamous intraepithelial lesions patients recognize vaccine antigens in the presence of activated dendritic cells, and produced high levels of CD8 + IFN γ +

T cells and low levels of IL-2 when induced to proliferate. **Infectious Agents and Cancer**. v. 7, n.1, p. 1-12, 2012.

HU, S.-Y.; REMILA, R.; ZHANG, Q.; DONG, L.; ZHANG, L.; FENG, R.-M.; ZHAO, X.-L.; CHEN, F.; ZHANG, X.; PAN, Q.-J.; ZHANG, W.-H.; MA, J.-F.; QIAO, Y.-L.; ZHAO, F.-H. Progression and regression of women with biopsy-confirmed normal cervical epithelium or cervical intraepithelial neoplasia grade 1: a 15-year population-based cohort study in China. **The Lancet**, v. 390, n. 4, p. S99, 2017.

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

HUSAIN, R.S. A.; RAMAKRISHNAN V. Global Variation of Human Papillomavirus Genotypes and Selected Genes Involved in Cervical Malignancies. **Annals of Global Health**. v. 81, n. 5, 2015, p. 675-683,2015.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. INCA. **Diretrizes para o rastreamento do câncer do colo do útero. 2011** Disponível em:< http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/rastreamento_cancer_colo_uterio.pdf > Acesso em 16 de Maio de 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. INCA. **Câncer do colo do útero**. Disponível em:< <http://www.inca.gov.br/uterio> >. Acesso em 30 de Abril de 2019 a.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2018. Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em:< <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp> > Acesso em 07 de Maio de 2019 b.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. INCA **Câncer do colo do útero. 2018** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-uterio>> Acesso em 18 de Maio de 2019 c.

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

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC. **Introdução à anatomia do colo uterino.** Disponível em: <<http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=4&chap=1>>. Acesso em 15 de Maio de 2019 a.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC. **Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginners' manual. Chapter 2: An Introduction to Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN).** Disponível em:< <http://screening.iarc.fr/colpochap.php?chap=2> > Acesso em 09 de Maio de 2019 b.

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

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. ICTV. **Papillomaviridae.** Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsdnaviruses/w/papillomaviridae >. Acesso em 09 de novembro de 2019.

ISMAIL, S. M.; COLCLOUGH, A. B.; DINNEN, J. S.; EAKINS, D.; EVANS, D. M.; GRADWELL, E.; O'SULLIVAN, J. P.; SUMMERELL J. M; NEWCOMBE, R. G. Observer variation in histopathological diagnosis and grading of cervical intraepithelial neoplasia. **BMJ.** v. 298, n. 6675, p. 707–710, 1989.

ITOH, M.; NELSON, C. M.; MYERS, C. A.; BISSELL, M. J. RAP1 integrates tissue polarity, lumen formation, and tumorigenic potential in human breast epithelial cells. **Cancer research**. v. 67, n. 10, p. 4759–4766, 2007.

JĄSKIEWICZ, A.; PAJAŁ, B.; ORZECZOWSKI, A. The Many Faces of Rap1 GTPase. **Int. J. Mol. Sci.** v. 19, n. 10, E2848, 2018.

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

JUCKETT, G.; HARTMAN-ADAMS, H. Human Papillomavirus: Clinical Manifestations and Prevention. **American Family Physician**. v. 82, n. 10, p. 1209 – 1214, 2010.

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

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

KIM, N. R.; KANG, M.; LEE, S. P.; KIM, H.; AN, J.; CHUNG, D. H.; HA, S. Y.; CHO, H. Y. Uncommon and rare human papillomavirus genotypes relating to cervical carcinomas. *Korean journal of pathology*, v. 48, n. 1, p. 43–49, 2014.

KING, L. E.; FISK, J. C.; DORNAN, E. S.; DONALDSON, M. M.; MELENDY, T.; MORGAN, I. M. Human papillomavirus E1 and E2 mediated DNA replication is not arrested by DNA damage signaling. **Virology**. v. 406, n. 1, p. 95–102, 2010.

KITAYAMA, H.; SUGIMOTO, Y.; MATSUZAKI, T.; IKAWA, Y.; NODA, M. A ras-related gene with transformation suppressor activity. **Cell**. v. 56, n. 1, p. 77-84, 1989.

KJÆR, S. K.; FREDERIKSEN, K.; MUNK, C.; IFTNER, T. Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 102, n. 19, p. 1478–1488, 2010.

KLAES, R.; FRIEDRICH, T.; SPITKOVSKY, D.; RIDDER, R.; RUDY, W.; PETRY, U.; DALLENBACH-HELLWEG, G.; SCHMIDT, D.; DOEBERITZ, M. V. K. Overexpression of p16INK4A as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. **Int J Cancer**. v. 92, n. 2, p. 276-284, 2001.

KOCJAN, B. J.; MAVER, P. J.; HOSNJAK, L.; ZIDAR, N.; ODAR, K.; GALE, N.; POLJAK, M. Comparative evaluation of the Abbott RealTime High Risk HPV test and INNO-LiPA HPV Genotyping Extra test for detecting and identifying human papillomaviruses in archival tissue specimens of head and neck cancers. **Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat**. v. 21, n. 4, p. 73-5, 2012.

KOGO, R.; HOW, C.; CHAUDARY, N.; BRUCE, J.; SHI, W.; HILL, R. P.; ZAHEDI, P.; YIP K. W.; LIU, F.-F. The microRNA-218~Survivin axis regulates migration, invasion, and lymph node metastasis in cervical cancer. **Oncotarget**. v.6, n. 2, p. 1090 -1100, 2015.

KOOISTRA, M. R.; DUBÉ, N.; BOS, J.L. Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation. **J Cell Sci**. v. 120, p. 17-22, 2007.

LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**. v. 294, n. 5543, p. 853-8, 2001.

LAJER, C. B.; GARNÆS, E.; FRIIS-HANSEN, L.; NORRILD, B.; THERKILDSEN, M. H.; GLUD, M.; ROSSING, M.; LAJER, H.; SVANE, D.; SKOTTE, L.; SPECHT, L.; BUCHWALD, C.; NIELSEN, F. C. The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers: bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer. **British Journal of Cancer**. v. 106, n. 9, p. 1526–1534, 2012.

LAKSHMIKANTHAN, S.; SOBCZAK, M.; CHUN, C.; HENSCHER, A.; DARGATZ, J.; RAMCHANDRAN, R.; CHRZANOWSKA-WODNICKA, M. Rap1 promotes VEGFR2 activation and angiogenesis by a mechanism involving integrin $\alpha v \beta_3$. **Blood**. v. 118, n. 7, p. 2015-26, 2011.

LAU, N. C.; LIM, L. P.; WEINSTEIN, E. G.; BARTEL, D. P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science**. v. 294, n. 5543, p. 858-62, 2001.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**. v. 75, n. 5, p. 843-54, 1993.

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

LETO, M. G. P.; SANTOS JÚNIOR, G. F.; PORRO, A. M.; TOMIMORI, J. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **An Bras Dermatol**. v. 86, n. 2, p. 306-317, 2011.

LIANG, B.; LI, Y.; WANG, T. A three miRNAs signature predicts survival in cervical cancer using bioinformatics analysis. **Scientific Reports**. v.7, n. 1, 5624, 2017.

LIE, A. K.; TROPÉ, A.; SKARE, G. B.; BJØRGE, T.; JONASSEN, C. M.; BRUSEGARD, K.; LÖNNBERG, S. HPV genotype profile in a Norwegian cohort with ASC-US and LSIL cytology with three year cumulative risk of high grade cervical neoplasia. **Gynecologic Oncology**. v. 148, n. 1, p. 111 – 117, 2018.

LIMA, M. A. P.; SILVA, C. G. L.; RABENHORST, S. H. B. Papel das Proteínas Precoces do Papilomavírus Humano na Carcinogênese. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v 59 n. 4, p. 565-573, 2013.

LOBATO, S. **Análise da expressão das proteínas P16INK4A, KI67 E MCM7 e da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) na progressão das Lesões**

Escamosas Intra-epiteliais do Colo Uterino. 2011. 146 f. Tese (Doutor em Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

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

LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Prophylactic human papillomavirus vaccines. **J Clin Invest.** v. 116, n. 5, p. 1167–1173, 2006.

MA, Y.; ZHANG, P.; YANG, J.; LIU, Z.; YANG, Z.; QIN, H. Candidate microRNA biomarkers in human colorectal cancer: systematic review profiling studies and experimental validation. **Int. J. Cancer.** v. 130, n. 9, p. 2077–2087, 2012.

MAERTENS, O.; CICHOWSKI, K. An expanding role for RAS GTPase-activating proteins (RAS GAPs) in cancer. **Adv. Biol. Regul.** v. 55, p.1–14. 2014.

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

MANOS, M. M.; TING, Y.; WRIGHT, D. K.; LEWIS, A. J.; BROKER, T. R.; WOLINSKY, S. M. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells.** v. 7, p. 209-214, 1989.

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

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

MATSUMOTO, K.; OKI, A.; FURUTA, R.; MAEDA, H.; YASUGI, T.; TAKATSUKA, N.; MITSUHASHI, A.; FUJII, T.; HIRAI, Y.; IWASAKA, T.; YAEGASHI, N.; WATANABE, Y.; NAGAI, Y.; KITAGAWA, T.; YOSHIKAWA H. Predicting the progression of cervical precursor lesions by human papillomavirus genotyping: a prospective cohort study. **Int. J. Cancer**. v. 128, p. 2898–2910, 2011.

MCBRIDE, A. A.; WARBURTON, A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. **PLoS Pathog.** v. 13, n. 4, p. e1006211, 2017.

MEJÍA, L.; MUÑOZ, D.; TRUEBA, G.; TINOCO, L.; ZAPATA, S. Prevalence of Human Papillomavirus Types in Cervical Cancerous and Precancerous Lesions of Ecuadorian Women. **Journal of Medical Virology**. v. 88, p. 144–152, 2016.

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

MINATO N. Rap G protein signal in normal and disordered lymphohematopoiesis. **Exp Cell Res.** v. 319, n. 15, p. 2323-8, 2013.

MITCHELL, M. F.; SCHOTTENFELD, D.; TORTOLERO-LUNA, G.; CANTOR, S. B.; RICHARDS-KORTUM, R. Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. **Obstet Gynecol.** v. 91, n. 4, p. 626–31, 1998.

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

MITRA, R. S.; ZHANG, Z.; HENSON, B. S.; KURNIT, D. M.; CAREY, T. E.; D'SILVA, N. J. RAP1A and RAP1B ras-family proteins are prominently expressed in the nucleus of squamous carcinomas: nuclear translocation of GTPbound active form. **Oncogene**. v. 22, n. 40, p. 6243-56, 2003.

MOBERG, M.; GUSTAVSSON, I.; WILANDER, E.; GYLLENSTEN, U. High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. **Br J Cancer**. v. 92, p. 891–4, 2005.

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

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

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

MOSCICKI, A. B.; SHIBOSKI S., HILLS, N.K., POWELL, K. J.; JAY, N.; HANSON, E. N.; MILLER, S.; CANJURA-CLAYTON, K. L.; FARHAT, S.; BROERING, J. M.; DARRAGH, T. M. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. **Lancet**. v. 364, n. 9446, p. 167-883, 2004.

MOSCICKI, A. B.; MA, Y.; WIBBELSMAN, C.; DARRAGH, T. M.; POWERS, A.; FARHAT, S.; SHIBOSKI, S. Rate of and risks for regression of cervical intraepithelial

neoplasia 2 in adolescents and young women. **Obstet Gynecol.** v. 116, n.6, p. 1373-80, 2010.

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

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

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

NAKAGAWA, J.T. T.; SCHIRMER, J.; BARBIERI, M. Vírus HPV e câncer de colo de útero. **Rev. bras. enferm.** v. 63, n. 2, p. 307-311, 2010.

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

NAKAHARA, T.; KIYONO, T. Interplay between NF- κ B/interferon signaling and the genome replication of HPV. **Future Virol.** v. 11, n. 2, p. 141–155, 2016.

NANDA, K.; MCCRORY, D. C.; MYERS, E. R.; BASTIAN, L. A.; HASSELBLAD, V.; HICKEY, J. D.; MATCHAR, D. B. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. **Ann Intern Med.** v. 132, n. 10, p. 810–9, 2000.

NI, L.; FRANCESCHI, S.; HOWELL-JONES, R.; SNIJDERS, P. J. F.; CLIFFORD, G. M. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers

worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. **Int. J. Cancer.** v. 128, p. 927–935, 2011.

NUOVO G. False positive results In diagnostic immunohistochemistry are related to horseradish peroxidase conjugates in commercially available assays. **Ann Diagn Pathol.** v. 25, p. 54-9, 2016.

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

O'HURLEY, G.; SJÖSTEDT, E.; RAHMAN, A.; LI, B.; KAMPF, C.; PONTÉN, F.; GALLAGHER, W. M.; LINDSKOG, C. Garbage in, garbage out: A critical evaluation of strategies used for validation of immunohistochemical biomarkers. **Molecular Oncology.** v. 8, n. 4, p. 783-798, 2014.

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

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

OZBUN, M. A. Infectious human papillomavirus type 31b: purification and infection of an immortalized human keratinocyte cell line. **Journal of General Virology.** v. 83, p. 2753–2763, 2002.

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

PANNEKOEK, W. J.; KOOISTRA, M. R.; ZWARTKRUIS, F. J.; BOS, J. L. Cell-cell junction formation: the role of Rap1 and Rap1 guanine nucleotide exchange factors. **Biochim Biophys Acta**. v. 1788, n. 4, p. 790-796, 2009.

PARK, R. B.; ANDROPHY, E. J. Genetic Analysis of High-Risk E6 in Episomal Maintenance of Human Papillomavirus Genomes in Primary Human Keratinocytes **Journal of Virology**. v. 76, n. 22, p. 11359–11364, 2002.

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

PARK, E.; KIM, J-Y, CHOI, S.; KIM, D. S.; OH, Y. L. Carcinogenic risk of human papillomavirus (HPV) genotypes and potential effects of HPV vaccines in Korea. **Scientific Reports**. v. 9, n. 12556, 2019.

PASCOAL-XAVIER, M. A. **Caracterização da proteína RAP1 como biomarcador da Neoplasia Intraepitelial Cervical associada à infecção por papilomavírus humano (HPV)**. 2011. 169 f. Tese (Doutor em Ciências na área de Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PASCOAL-XAVIER, M. A.; FIGUEIREDO, A. C.; GOMES, L. I.; PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; CALZAVARA-SILVA, C. E.; COSTA, M. A.; REIS, I. A.; BONJARDIM, C. A.; KROON, E. G.; OLIVEIRA, J. G.; FERREIRA, P. C. RAP1 GTPase overexpression is associated with cervical intraepithelial neoplasia. **PLoS one**, v. 10, n. 4, p. e0123531, 2015.

PATEL, P. G.; SELVARAJAH, S.; BOURSALIE, S.; HOW, N. E.; EJDELMAN, J.; GUERARD, K-P.; LONGATTO FILHO, J. M.; LAPOINTE, J.; PARK, P. C.; OKELLO, J. B. A.; BERMAN D. M. Preparation of Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissue Cores for both RNA and DNA Extraction. **J Vis Exp**. v. 114, n. 54299, 2016.

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

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

PEREIRA, K. M. A.; SANTOS, P. P. A.; ROCHA, D. A. P.; LIMA, K. C. Papilomavírus humano e câncer oral: uma revisão dos conceitos atuais. **Rev Odontol UNESP**. v. 36, n. 2, p. 151-56, 2007.

PINIDIS, P.; TSIKOURAS, P.; IATRAKIS, G.; ZERVOUDIS, S.; KOUKOULI, Z.; BOTHOU, A.; GALAZIOS G.; VLADAREANU, S. Human Papilloma Virus' Life Cycle and Carcinogenesis. **Maedica**. v.11, n. 1, p. 48–54, 2016.

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

PIRAMI, L.; GIACHÈ, V.; BECCIOLINI, A. Analysis of HPV16, 18, 31, and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. **J Clin Pathol**. v. 50, n. 7, p. 600-4, 1997.

POON, M. W.; YAN, L.; JIANG, D.; QIN, P.; TSE, H. F.; WONG, I. Y.; WONG, D. S.; TERGAONKAR, V.; LIAN, Q. Inhibition of RAP1 enhances corneal recovery following alkali injury. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v. 56, n. 2, p. 711-21, 2015.

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

QUEIROZ, C.; SILVA, T.C.; ALVES, V. A.; VILLA, L. L.; COSTA, M. C.; TRAVASSOS, A. G.; FILHO, J. B.; STUDART, E.; CHETO, T.; DE FREITAS, L. A. P16(INK4a) expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. **Pathol Res Pract**. v. 202, n. 2, p. 77-83, 2006.

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

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

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

RAMOS-VARA. J. A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. **Vet Pathol**. v. 42, p. 405–426, 2005.

REINSON, T.; HENNO, L.; TOOTS, M.; USTAV JR., M.; USTAV, M. The Cell Cycle Timing of Human Papillomavirus DNA Replication. **PLoS ONE**. v. 10, n. 7: e0131675, 2015.

ROMANOWSKI P, MADINE MA. Mechanisms restricting DNA replication to once per cell cycle: the role of Cdc6 and ORC. **Trend Cell Biol**. v. 6, n. 5, p. 184-8, 1996.

ROSA, M. I.; MEDEIROS, L. R.; ROSA, D. D.; BOZZETI, M. C.; SILVA, F. R.; SILVA, B. R. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. **Cad. Saúde Pública**. v. 25, n. 5, p. 953-964, 2009.

SACHDEVA, M.; MO, Y.-Y. miR-145-mediated suppression of cell growth, invasion and metastasis. **American Journal of Translational Research**, v. 2, n. 2, p. 170–180, 2010.

SAH, S. K.; GONZÁLEZ, J. V.; SHRESTHA, S.; ADHIKARI, A.; MANANDHAR, K. D.; YADAV, S. B.; STEIN, D. A.; GUPTA, B. P.; PICCONI, M. A. Human papillomavirus

genotype distribution in cervical cancer biopsies from Nepalese women. **Infectious agents and cancer**. v. 13, n. 4, 2018.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**. v. 239, n. 4839, p. 487-91, 1988.

SAINI, N. E.; KUMAR, V. S.; CHIN, Y. S.; SALIH, F. High Prevalence of Human Papillomavirus Types 56 and 70 Identified in the Native Populations of Sabah, Malaysia. **Asian Pacific journal of cancer prevention**. v. 19, n. 10, p. 2807–2813, 2018.

SAWANT, K.; CHEN, Y.; KOTIAN, N.; PREUSS, K. M.; MCDONALD, J. A. Rap1 GTPase promotes coordinated collective cell migration in vivo. **Mol Biol Cell**. v. 29, n. 22, p. 2656-2673, 2018.

SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P. E.; JERONIMO, J.; RODRIGUEZ, A. C., WACHOLDER S. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**. v. 370, p. 890–907, 2007.

SCHIFFMAN, M.; VAUGHAN, L. M.; RAINE-BENNETT, T. R.; CASTLE, P. E.; KATKI, H. A.; GAGE, J. C., FETTERMAN, B.; BEFANO, B.; WENTZENSEN, N. A study of HPV typing for the management of HPV-positive ASC-US cervical cytologic results. **Gynecologic oncology**. v. 138, n. 3, p. 573–578, 2015

SCHMITZ, M; DRIESCH, C., JANSEN, L.; RUNNEBAUM, I.B.; DÜRST, M. Non-Random Integration of the HPV Genome in Cervical Cancer. **PLoS ONE**. v. 7 n. 6, p. e39632, 2012.

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

SEILER, C.; SHARPE, A.; BARRETT, J. C.; HARRINGTON, E. A.; JONES, E. V.; MARSHALL, G. B. Nucleic acid extraction from formalin-fixed paraffin-embedded

cancer cell line samples: a trade off between quantity and quality? **BMC Clinical Pathology**. v. 16, n. 17, p. 1- 13, 2016.

SENGÜVEN, B.; BARIS, E.; OYGUR, T.; BERKTAS, M. Comparison of methods for the extraction of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. **International journal of medical sciences**. v. 11, n. 5, p. 494–499, 2014.

SEPÚLVEDA-ARIAS, J. C.; ÁLVAREZ-ALDANA, A. **Burden of Human Papillomavirus Infection in Latin America, Current Topics in Public Health**, Alfonso J. Rodriguez-Morales. 2013. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/current-topics-in-public-health/burden-of-human-papillomavirus-infection-in-latin-america>> Acesso em 10 de Setembro de 2019.

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

SHAH, S.; BROCK, E. J.; JI, K.; MATTINGLY, R. R. Ras and Rap1: A tale of two GTPases. **Semin Cancer Biol**. v. 54, p. 29-39, 2019.

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

SHEN, G.; CHENG, J.; WANG, Y.; ZHOU, P.; ZHANG, G. Viral DNA load of high-risk human papilloma virus is closely associated with the grade of cervical lesions. **Int J Clin Exp Med**. v. 7, n. 12, p. 5826-31, 2014.

SHERMAN, M.E.; SCHIFFMAN, M.; COX, J. T. Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study G. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS). **J Natl Cancer Inst**. v. 94, p. 102–7, 2002.

SHERMAN, M. E.; WANG, S. S.; WHEELER, C. M.; RICH, L.; GRAVITT, P. E., TARONE, R., SCHIFFMAN, M. Determinants of Human Papillomavirus Load among

Women with Histological Cervical Intraepithelial Neoplasia 3. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and prevention**. v. 12, n. 10, 2003.

SHI, S. R.; SHI, Y.; TAYLOR, C. R. Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**. v. 59, n. 1, p. 13–32, 2011.

SHI, Y. R.; LIU, J.; HE, W.; YANG, Y. Expression of Micro-RNA 218 in Cervical Cancer and Its Effect on Proliferation, Apoptosis and Invasion of HeLa Cells. **Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**. v. 47, n. 5, p. 697-702, 2016.

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

SINGH, L.; GAO, Q.; KUMAR, A.; GOTOH, T.; WAZER, D. E.; BAND, H.; FEIG, L. A.; BAND, V. The high-risk human papillomavirus type 16 E6 counters the GAP function of E6TP1 toward small Rap G proteins. **Journal of virology**. v. 77, n. 2, p. 1614–1620, 2003.

SRINIVASAN, M.; SEDMAK, D.; JEWELL, S. Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. **Am J Pathol**. v. 161, n. 6, p. 1961–1971, 2002.

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

STRACHAN, T.; READ, A. **Genética Molecular Humana: expressão de gene humanos**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 345 – 380.

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

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

TAINIO, K.; ATHANASIOU, A.; TIKKINEN, K. A. O.; AALTONEN, R.; CÁRDENAS, J.; HERNÁNDES., G-L. S.; JAKOBSSON, M.; JORONEN, K.; KIVIHARJU, M.; LOUVANTO, K.; OKSJOKI, S.; TÄHTINEN, R.; VIRTANEN, S.; NIEMINEN, P.; KYRGIU, M.; KALLIALA, I. Clinical course of untreated cervical intraepithelial neoplasia grade 2 under active surveillance: systematic review and meta-analysis. **BMJ**. v. 360, n. k499, 2018.

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

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

TORTI, M.; LAPETINA, E. G. Structure and function of rap proteins in human platelets. **Thromb Haemost**. v. 71, n. 5, p. 533–543, 1994.

TOSUN, G.; SENDAG, F.; ZEYBEK, B.; COSAN, T. M.; GUVEN, C.; ZEKIOGLY, O.; BILGIN, O. Immunohistochemical expressions of p16 and p53 proteins in cervical intraepithelial neoplasia and in benign cervical tissue. **Eur J Gynaecol Oncol**. v. 31, n. 6, p. 627-31, 2010.

TSAKOGIANNIS, D.; GARTZONIKA, C.; LEVIDIOTOU-STEFANO, S.; MARKOULATOS, P. Molecular approaches for HPV genotyping and HPV-DNA physical status. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 19, n. E1, 2017. doi:10.1017/erm.2017.2

TSOUMPOU, I.; ARBYN, M.; KYRGIU, M.; WENTZENSEN, N.; KALIOPAULOS, G.; HIRSCH-MARTIN, P.; PARASKEVAIDIS, E. p16INK4a immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: A systematic review and meta-analysis. **Cancer Treat Rev.** v. 35, n. 3, p. 210-22, 2009.

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

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

VAN STAVEREN, W. C.; BEECKMAN, S.; TOMÁS, G.; DOM, G.; HÉBRANT, A.; DELYS, L.; VLIEM, M.J.; TRÉSALLET, C.; ANDRY, G.; FRANC, B.; LIBERT, F.; DUMONT, J.E.; MAENHAUT, C. Role of Epac and protein kinase A in thyrotropin-induced gene expression in primary thyrocytes. **Exp Cell Res.** v. 318, n. 5, p. 444-52, 2012.

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

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

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

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

WARBURTON, A.; REDMOND, C.J.; DOOLEY, K.E.; FU, H.; GILLISON, M.L.; AKAGI, K.; SYMER, D. E., ALADJEM, M. I.; MCBRIDE, A. A. HPV integration hijacks and multimerizes a cellular enhancer to generate a viral-cellular super-enhancer that drives high viral oncogene expression. **PLOS Genetics**. v. 14, n. 1, p. e1007179, 2018.

WAXMAN, A. G.; CHELMOW, D.; DARRAGH, T. M.; LAWSON, H.; MOSCICKI, A. B. Revised terminology for cervical histopathology and its implications for management of high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. **Obstetrics and gynecology**. v. 120, n. 6, p. 1465–1471, 2012.

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

WENNERBERG, K.; ROSSMAN, K. L.; DER, C. J. The Ras superfamily at a glance. **J Cell Sci**. v. 118, p. 843-6, 2005.

WHITE, P. W. ; TITOLO, S., BRAULT, K.; THAUVETTE, L. , PELLETIER, A. ; WELCHNER, E.; BOURGON, L.; DOYON, L.; OGILVIE, W. W. ; YOAKIM, C.; CORDINGLEY, M. G. ; ARCHAMBAULT, J. Inhibition of Human Papillomavirus DNA Replication by Small Molecule Antagonists of the E1-E2 Protein Interaction. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 278, n. 29, p. 26765-26772, 2003.

WIGHTMAN, B.; HÁ, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**. v. 75, n. 5, p. 855-62, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Human Papillomavirus**. Disponível em: <https://www.who.int/biologicals/areas/human_papillomavirus/en>. Acessado em 10 de setembro de 2019 a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Human papillomavirus (HPV)**. Disponível em: <<https://www.who.int/immunization/diseases/hpv/en/>>. Acessado em 20 de setembro de 2019 b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Cervical cancer**. Disponível em: <<https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/cervical-cancer/en/>>.

Acessado em 01 de outubro de 2019 c.

WRIGHT, D. K.; MANOS, M. M. Sample preparation from paraffin-embedded tissue
In: INNIS, M.A. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. Ed. San Diego: Academic Press, 1990. p. 153-158.

YAJNIK, V.; PAULDING, C.; SORDELLA, R.; MCCLATCHEY, A.I.; SAITO, M.; WAHRER, D. C. R.; REYNOLDS, P.; BELL, D. W.; LAKE, R.; VAN DEN HEUVEL, S.; SETTLEMAN, J.; HABER, D. A. DOCK4, a GTPase activator, is disrupted during tumorigenesis. **Cell**. v. 112, n. 5, p. 673–84, 2003.

YOSHIDA, T.; IWATA, T.; TAKAI, Y.; BIRCHMEIER, W.; YAMATO, M.; OKANO, T. Afadin requirement for cytokine expressions in keratinocytes during chemically induced inflammation in mice. **Genes Cells**. v. 19, n. 11, p. 842-52, 2014.

ZHANG, L.; CHENWEI, L.; MAHMOOD, R.; VAN GOLEN, K.; GREENSON, J.; LI, G.; D'SILVA, N.J.; LI, X.; BURANT, C. F.; LOGSDON, C. D.; SIMEONE, D. M. Identification of a putative tumor suppressor gene Rap1GAP in pancreatic cancer. **Cancer Res**. V. 66, n. 2, p. 898-906, 2006.

ZHANG, G.; YANG, B.; ABDUL-KARIM, F. W. p16 Immunohistochemistry is useful in confirming high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) in women with negative HPV testing. **Int J Gynecol Pathol**. v. 34, n. 2, p. 180-6, 2015.

ZHANG, Y. L.; WANG, R. C.; CHENG, K.; RING, B. Z.; SU, L. Roles of Rap1 signaling in tumor cell migration and invasion. **Cancer biology & medicine**. v. 14, n. 1, p. 90–99, 2017.

ZHANG, L.; BI, Q.; DENG, H.; XU, J.; CHEN, J.; ZHANG, M.; MU, X. Human papillomavirus infections among women with cervical lesions and cervical cancer in

Eastern China: genotype-specific prevalence and attribution. **BMC infectious diseases**. v.17, n. 1, 107- 116, 2017.

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

ZHENG, Z.; BAKER, C. C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **Front Biosci**. v. 11, p. 2286–2302, 2006.

ZHENG, J. Diagnostic value of MCM2 immunocytochemical staining in cervical lesions and its relationship with HPV infection. **International journal of clinical and experimental pathology**. v. 8, n. 1, p. 875–880, 2015.

ZHOU, X.; YUE, Y.; WANG, R.; GONG, B.; DUAN, Z. MicroRNA-145 inhibits tumorigenesis and invasion of cervical cancer stem cells. **International Journal of Oncology**. v. 50,n. 3, p. 853-862, 2017.

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

ANEXO A - Carta de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE MICRO RNAs COMO BIOMARCADORES DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL

Pesquisador: Maria Gabrielle de Lima Rocha

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 82118517.1.1001.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.533.704

Apresentação do Projeto:

Estudo multicêntrico retrospectivo utilizará 120 amostras parafinadas de biópsias do colo uterino, que serão classificadas em negativas para neoplasia, em positivas para neoplasias intraepiteliais cervicais, em seus diferentes graus (I, II e III) e em neoplasias invasivas do colo uterino, sendo pretendido coletar 20 amostras de cada grupo.

Segundo a metodologia, serão adquiridas nos diversos laboratórios de Anatomia Patológica em Belo Horizonte. Os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes doadores das amostras parafinadas serão restritos, consistindo apenas do diagnóstico laboratorial da lesão e idade do paciente. O DNA será utilizado para identificação da infecção por HPV e tipagem. O RNA será convertido em cDNA e utilizado na quantificação dos microRNAs 34a, 145 e 218 por meio da técnica de PCR em tempo real, também a ser padronizada. Este trabalho busca correlacionar a expressão dos miRNAs 34a, 145 e 218 com a presença ou ausência de neoplasia cervical, com o grau da neoplasia cervical, a presença ou não do HPV e seu tipo.

Objetivo da Pesquisa:

Foram definidos no projeto:

Objetivo Primário: avaliar a expressão dos miRNAs 34a, 145 e 218.

Objetivo Secundário: 1) Correlacionar a expressão dos miRNAs 34a, 145 e 218 com a presença ou ausência de neoplasia cervical; 2) Correlacionar a expressão dos miRNAs 34a, 145 e 218 com o

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.533.704

grau da neoplasia cervical;3) Correlacionar a expressão dos miRNAs 34a, 145 e 218 com a presença ou não do HPV e seu tipo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

São descritos:

Riscos: são mínimos, pois iremos utilizar amostras parafinadas de arquivos dos laboratórios de Anatomia Patológica de Belo Horizonte. Os dados particulares do paciente como nome e idade serão mantidos em sigilo e as amostras utilizadas serão codificadas.

Benefícios: Devido à elevada incidência, prevalência e mortalidade, o câncer cervical é considerado um grande problema de saúde pública. No Brasil e em várias partes do mundo, a estratégia mais utilizada para o rastreamento e prevenção do câncer de colo do útero é a realização periódica do exame de citologia oncológica. É sabido que este exame possui uma grande variabilidade em sua sensibilidade e que a mesma depende de vários outros fatores que vão desde a coleta até a interpretação. Quando executado em excelentes condições, a sensibilidade não é superior a 70% podendo chegar a valores muito baixos de 20%. Por este motivo, é grande a procura por biomarcadores que permitam um diagnóstico precoce e preciso, identificando a doença em seus estágios iniciais. O diagnóstico precoce e o tratamento adequado permitem a cura de, praticamente, 100% dos casos. Os miRNAs têm demonstrado grande potencial para biomarcadores tumorais, mas os estudos ainda são escassos e inconclusivos. Os miRNAs a serem estudados neste trabalho foram escolhidos por se mostrarem mais relevantes e por terem demonstrando expressão diferencial de acordo com o acometimento cito e histológico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto relevante para a área da saúde. Haverá uso de fontes secundárias de dados dos pedidos de exame encaminhados ao laboratório juntamente com as amostras para análise e o resultado da biópsia. As informações contidas nesses pedidos consistem em nome, filiação, sexo, idade, uso de hormônios, data da última menstruação e, caso o médico julgue necessário, alguma descrição clínica da doença.

Estudo multicêntrico com a participação da ASSOCIACAO MARIO PENNA, sendo submetido ao Comitê de Ética Hospital Luxemburgo /Fundação Mário Penna/ Associação Mário Penna - MG.

Solicita dispensa do TCLE com a justificativa: "Não iremos lidar com o paciente de forma direta. Não teremos acesso aos mesmos, pois iremos trabalhar com amostras de arquivo. Consideramos pequenos os riscos para o paciente e reforçamos o compromisso de sigilo quanto ao seu nome. Os pacientes em momento algum nesse estudo

serão identificados. As amostras serão codificadas e os dados apenas relacionados com a idade e

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.533.704

uso de hormônios."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Folha de rosto preenchida e assinada.
- Modelo de carta convite: "Convidamos o Laboratório sob sua gestão, a participar de um estudo que será desenvolvido na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais que tem por finalidade estudar amostras de biópsias do colo do útero, infectadas ou não pelo Papilomavírus Humano, na presença ou ausência de lesões associadas a este vírus... Desta forma, o laboratório participaria da pesquisa no fornecimento de amostras parafinadas de biópsia do colo do útero e com o resultado histopatológico destas. Todos os trabalhos científicos produzidos a partir desta pesquisa terão o nome do laboratório citado."
- Modelo de Carta de aceite: "...Declaramos, para os devidos fins, que concordamos em disponibilizar aos pesquisadores deste estudo, para o desenvolvimento das atividades referentes ao Projeto de Pesquisa, pelo período de execução previsto no referido Projeto, amostras parafinadas de biópsias do colo do útero, disponíveis no arquivo do laboratório, com o resultado histopatológico destas..."
- Justificativa para a Ausência do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: "Solicitamos a ausência do TCLE já que não iremos lidar com o paciente de forma direta, pois iremos trabalhar com amostras de arquivo. Consideramos pequenos os riscos para o paciente e reforçamos o compromisso de sigilo quanto ao seu nome. Os pacientes em momento algum nesse estudo serão identificados. As amostras serão codificadas e os dados apenas relacionados com a idade, uso de hormônios e diagnóstico da biópsia."
- Parecer aprovado Add Referendum pelo Departamento de Análises Clínicas e Toxológicas da Faculdade de Farmácia, em 01/12/2017.

Recomendações:

Segundo a Resolução CNS 466/12, o estudo de amostras de pacientes, mesmo que retrospectivo necessita de TCLE em caso de acesso os dados dos mesmos sem codificação. Como foi informado que as amostras serão codificadas e os dados apenas relacionados com a idade e uso de hormônios, deve-se, portanto, incluir no Modelo de Carta ao Laboratório, esta informação. de forma a preservar o anonimato do participante. Exemplo: Os dados fornecidos pelo Laboratório devem estar codificados (enumerados ou iniciais) relacionados com a idade e uso de hormônios. Também deverão ser entregues codificados as informações que serão usadas nas fontes secundárias de dados (pedidos de exame encaminhados ao laboratório juntamente com as amostras para análise e o resultado da biópsia). Desta forma, preserva-se o anonimato do

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.533.704

participante, e possível identificação do participante pelos pesquisadores deste projeto."
Este Comitê confia que as mudanças serão realizadas pelos pesquisadores.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Confiando que as alterações solicitadas nas recomendações serão realizadas pelo pesquisador, sou, S.M.J., a favor da aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1055838.pdf	30/12/2017 12:55:32		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_TCLE.docx	30/12/2017 12:54:52	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Parecer Anterior	parecer3.jpg	30/12/2017 12:47:22	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Parecer Anterior	parecer2.jpg	30/12/2017 12:47:01	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Parecer Anterior	parecer1.jpg	30/12/2017 12:46:30	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.doc	30/12/2017 12:45:30	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Outros	Carta_Convite.docx	30/12/2017 12:02:03	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Outros	Carta_Aceite.doc	30/12/2017 12:01:30	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_final.docx	30/12/2017 11:59:28	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	30/12/2017	Maria Gabrielle de	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.533.704

Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	11:58:26	Lima Rocha	Aceito
Outros	82118517parecer.pdf	08/03/2018 17:04:28	Vivian Resende	Aceito
Outros	82118517aprovacao.pdf	08/03/2018 17:04:39	Vivian Resende	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 08 de Março de 2018

Assinado por:
Vivian Resende
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

ANEXO B – Emenda da Carta de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE MICRO RNAs COMO BIOMARCADORES DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL

Título atual: AVALIAÇÃO DE RAP1 COMO BIOMARCADOR DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL

Pesquisador: Maria Gabrielle de Lima Rocha

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 82118517.1.1001.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.692.943

Apresentação do Projeto:

Trata-se de solicitação de Emenda ao Projeto "AVALIAÇÃO DE MICRO RNAs COMO BIOMARCADORES DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL Título atual: AVALIAÇÃO DE RAP1 COMO BIOMARCADOR DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL"

De acordo com a pesquisadora, este projeto tinha, inicialmente, como objetivo avaliar a expressão dos miRNAs 34a, 145 e 218 e correlacionar suas expressões com a presença ou ausência de neoplasia cervical, com o grau desta lesão e com a presença ou não de HPV e seu tipo. No entanto, estas análises não foram possíveis, devido à qualidade do material biológico envolvido em parafina que interferiram nos testes de PCR em tempo real.

Por este motivo, os pesquisadores pedem anuência no novo objetivo do projeto, utilizando o mesmo tipo de material biológico.

A nova metodologia proposta é descrita a seguir:

Neste estudo serão incluídas amostras parafinadas de biópsias cervicais e estas serão classificadas em negativas para neoplasia infectadas ou não pelo HPV, positivas para neoplasia intraepitelial, em todos os seus estágios (NIC I, II e III) e em positivas para neoplasia invasora. Estas amostras serão coletadas em laboratórios de Anatomia Patológica na região metropolitana de Belo Horizonte.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.692.943

Pretende-se coletar 20 amostras de cada grupo. Alguns dados como a idade da paciente, utilização de hormônios e o diagnóstico fornecido pelo laboratório serão coletados. As amostras serão submetidas a tratamento para a sua desparafinização e seu material genético, DNA, extraído em protocolos a serem testados. O DNA será utilizado para identificação da infecção por HPV. Cortes histológicos também realizados para preparar amostras para a imuno-histoquímica. A expressão da proteína RAP1 será correlacionada com a presença ou não do HPV, presença ou ausência de lesão e seu grau.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo proposta nesta Emenda:

Alteração do projeto AVALIAÇÃO DE MICRO RNAs COMO BIOMARCADORES DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL, Para: AVALIAÇÃO DE RAP1 COMO BIOMARCADOR DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL.

Objetivo Primário Atual: Avaliar a expressão de RAP1.

Objetivo Secundário:

- 1) Correlacionar a expressão de RAP1 com a presença ou ausência de neoplasia cervical;
- 2) Correlacionar a expressão de RAP1 com o grau da neoplasia cervical;
- 3) Correlacionar a expressão de RAP1 com a presença ou não do HPV.

Avaliar a expressão da proteína RAP1 por imunohistoquímica e relacionar sua expressão com a presença ou ausência de neoplasia cervical, com o grau desta lesão e com a presença ou ausência do HPV.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e Benefícios apresentados:

Os riscos para o paciente são mínimos, pois iremos utilizar amostras parafinadas de arquivos dos laboratórios de Anatomia Patológica de Belo Horizonte. Os dados particulares do paciente como nome e idade serão mantidos em sigilo e as amostras utilizadas serão codificadas.

Benefícios: Devido à elevada incidência, prevalência e mortalidade, o câncer cervical é considerado um grande problema de saúde pública. No Brasil e em várias partes do mundo, a estratégia mais utilizada para o rastreamento e prevenção do câncer de colo do útero é a realização periódica do exame de citologia oncológica. É sabido que este exame possui uma grande variabilidade em sua sensibilidade e que a mesma depende de vários outros fatores que vão desde a coleta até a interpretação. Quando executado em excelentes condições, a sensibilidade não é superior a 70% podendo chegar a valores muito baixos de 20%. Por este motivo, é grande a procura por

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.692.943

biomarcadores que permitam um diagnóstico precoce e preciso, identificando a doença em seus estágios iniciais. O diagnóstico precoce e o tratamento adequado permitem a cura de, praticamente, 100% dos casos. Os miRNAs têm demonstrado grande potencial para biomarcadores tumorais, mas os estudos ainda são escassos e inconclusivos. A proteína RAP1 a ser estudada neste trabalho demonstrou ser um possível biomarcador.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esta emenda ao projeto de pesquisa objetiva alterar o objetivo inicialmente proposto para: Correlacionar a expressão de RAP1 com a presença ou ausência de neoplasia cervical, com o grau da neoplasia cervical, a presença ou não do HPV.

Pede-se também, a alteração do título de : "Alteração do projeto AVALIAÇÃO DE MICRO RNAs COMO BIOMARCADORES DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL", Para: "AVALIAÇÃO DE RAP1 COMO BIOMARCADOR DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL".

O motivo desta solicitação é por não terem obtido sucesso na primeira proposta. De acordo com os mesmos, as análises não foram possíveis, devido à qualidade do material biológico envolvido em parafina que interferiram nos testes de PCR em tempo real.

Eles reforçam a relevância desta linha de pesquisa e da proposta do novo objetivo com referências da literatura.

Embora haja mudança na metodologia, esta não altera os riscos em relação ao projeto mais recente aprovado.

Hipótese: Em levantamento bibliográfico realizado, RAP1 foi apontada como um possível marcador para avaliação da progressão de lesões neoplásicas do colo do útero. Entretanto, os estudos são escassos.

Hipótese: RAP1 é realmente um bom marcador? Pode ser utilizado no diagnóstico precoce do câncer de colo do útero?

Eles afirmam que a alteração do projeto não atinge os participantes da pesquisa já que haverá apenas mudança no alvo a ser pesquisado (molecular) e na metodologia de avaliação da expressão destas (de PCR em tempo Real para imuno-histoquímica).

Nesta nova proposta serão utilizadas as mesmas amostras, organizadas nos mesmos grupos.

Desfecho Primário: Avaliar a utilização de RAP1 na prática clínica como biomarcador precoce para a evolução do câncer de colo do útero.

Tamanho da Amostra no Brasil: 120 (em 6 grupos de 20).

Dados dos pacientes a serem obtidos: Serão utilizados dados dos pedidos de exame encaminhados ao laboratório juntamente com as amostras para análise e o resultado da biópsia.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.692.943

As informações contidas nesses pedidos são mínimas e consistem em nome, filiação, sexo, idade, uso de hormônios, data da última menstruação e, caso o médico julgue necessário, alguma descrição clínica da doença.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentada carta de solicitação de Emenda devidamente justificada.

Recomendações:

Embora as mudanças metodológicas propostas não sejam significativas em relação a obtenção dos materiais biológicos e nem aos riscos aos pacientes (quando considera-se o projeto mais recente aprovado), recomenda-se que seja submetida emenda com justificativa de atualização de cronograma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conforme as considerações apresentadas, sou, S.M.J., favorável à aprovação da Emenda ao projeto AVALIAÇÃO DE MICRO RNAs COMO BIOMARCADORES DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL
Título atual: AVALIAÇÃO DE RAP1 COMO BIOMARCADOR DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1455327_E1.pdf	18/10/2019 11:16:42		Aceito
Outros	carta.jpg	18/10/2019 11:15:52	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Outros	82118517aprovacao.pdf	08/03/2018 17:04:39	Vivian Resende	Aceito
Outros	82118517aprovacao.pdf	08/03/2018	Vivian Resende	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.692.943

Outros	82118517aprovacao.pdf	17:04:39	Vivian Resende	Aceito
Outros	82118517parecer.pdf	08/03/2018 17:04:28	Vivian Resende	Aceito
Outros	82118517parecer.pdf	08/03/2018 17:04:28	Vivian Resende	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_TCLE.docx	30/12/2017 12:54:52	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Parecer Anterior	parecer3.jpg	30/12/2017 12:47:22	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Parecer Anterior	parecer2.jpg	30/12/2017 12:47:01	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Parecer Anterior	parecer1.jpg	30/12/2017 12:46:30	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.doc	30/12/2017 12:45:30	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Outros	Carta_Convite.docx	30/12/2017 12:02:03	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Outros	Carta_Aceite.doc	30/12/2017 12:01:30	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_final.docx	30/12/2017 11:59:28	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	30/12/2017 11:58:26	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 08 de Novembro de 2019

Assinado por:
Eliane Cristina de Freitas Rocha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

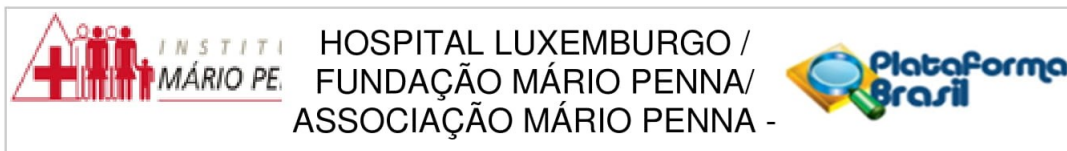
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

ANEXO C - Carta de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Luxemburgo



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE MICRO RNAs COMO BIOMARCADORES DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL

Pesquisador: Maria Gabrielle de Lima Rocha

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 82118517.1.3001.5121

Instituição Proponente: ASSOCIACAO MARIO PENNA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.662.189

Apresentação do Projeto:

AVALIAÇÃO DE MICRO RNAs COMO BIOMARCADORES DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL

Trata-se de respostas a pendências de parecer anterior deste CEP, com número 2.592.289.

Objetivo da Pesquisa:

Os mesmos como no parecer número 2.592.289 deste colegiado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os mesmos como no parecer número 2.592.289 deste colegiado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os mesmos como no parecer número 2.592.289 deste colegiado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- a) Folha de rosto: apresentada;
- b) Projeto detalhado: adequado;
- c) Declaração de compromisso do(s) pesquisador(es) responsável(is): não apresentada;
- d) Orçamento financeiro: apresentado;
- e) Cronograma: apresentado cronograma geral, porém não há declaração de que a pesquisa somente será iniciada a partir da aprovação pelo CEP do Instituto Mário Penna;
- f) Justificativa para a Ausência do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE): "Solicitamos

Endereço: Rua Gentios, nº 1420

Bairro: Luxemburgo

CEP: 30.380-472

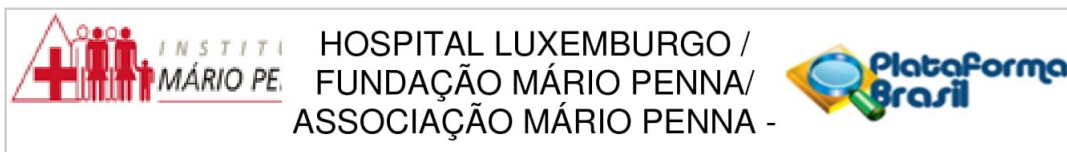
UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3299-9980

Fax: (31)3299-9943

E-mail: comiteetica@mariopenna.org.br



Continuação do Parecer: 2.662.189

a ausência do TCLE já que não iremos lidar com o paciente de forma direta, pois iremos trabalhar com amostras de arquivo. Consideramos pequenos os riscos para o paciente e reforçamos o compromisso de sigilo quanto ao seu nome. Os pacientes em momento algum nesse estudo serão identificados. As amostras serão codificadas e os dados apenas relacionados com a idade, uso de hormônios e diagnóstico da biópsia";

g) Carta de anuência das instituições envolvidas no projeto de pesquisa: adequada;

Recomendações:

- 1) Apresentar declaração de compromisso do(s) pesquisador(es) responsável(is);
- 2) Acrescentar no cronograma a observação de que a pesquisa somente será iniciada a partir da aprovação pelo CEP IMP.
- 3) No TCLE, a solicitação de dispensa do mesmo está aprovada para os pacientes que não permanecem em seguimento na instituição. Para aqueles que mantem retorno e seguimento na instituição, recomendamos a obtenção de TCLE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando que as recomendações de parecer anterior não foram respondidas na sua totalidade, restando pendências, o projeto de pesquisa permanece como pendente.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1090347.pdf	23/04/2018 16:27:55		Aceito
Outros	carta.pdf	23/04/2018 16:27:30	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Outros	Pesquisadores.docx	23/04/2018 16:27:07	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Outros	82118517aprovacao.pdf	08/03/2018 17:04:39	Vivian Resende	Aceito
Outros	82118517aprovacao.pdf	08/03/2018 17:04:39	Vivian Resende	Aceito
Outros	82118517parecer.pdf	08/03/2018 17:04:28	Vivian Resende	Aceito
Outros	82118517parecer.pdf	08/03/2018 17:04:28	Vivian Resende	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	Justificativa_TCLE.docx	30/12/2017 12:54:52	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito

Endereço: Rua Gentios, nº 1420

Bairro: Luxemburgo

CEP: 30.380-472

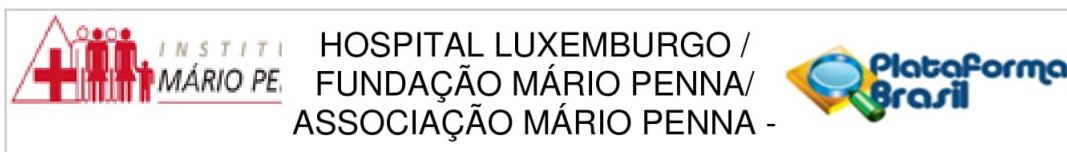
UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3299-9980

Fax: (31)3299-9943

E-mail: comiteetica@mariopenna.org.br



Continuação do Parecer: 2.662.189

Justificativa de Ausência	Justificativa_TCLE.docx	30/12/2017 12:54:52	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Parecer Anterior	parecer3.jpg	30/12/2017 12:47:22	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Parecer Anterior	parecer2.jpg	30/12/2017 12:47:01	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Parecer Anterior	parecer1.jpg	30/12/2017 12:46:30	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Outros	Carta_Convite.docx	30/12/2017 12:02:03	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Outros	Carta_Aceite.doc	30/12/2017 12:01:30	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_final.docx	30/12/2017 11:59:28	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 18 de Maio de 2018

Assinado por:
Stella Sala Soares Lima
(Coordenador)

Endereço: Rua Gentios, nº 1420
Bairro: Luxemburgo **CEP:** 30.380-472
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3299-9980 **Fax:** (31)3299-9943 **E-mail:** comiteetica@mariopenna.org.br

ANEXO D -

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

Reagentes	Concentração	Concentração/tubo	Volume/tubo
GH20 (Eurofins®)	10 pmol/ μ l	10 pmol	1 μ l
PC04 (IDT®)	10 pmol/ μ l	10 pmol	1 μ l
Tampão IB (Phoneutria®)	10x	1x	1 μ l
dNTP Mix (QuatroG®)	2,5 Mm	200 μ M	0,8 μ l
Taq DNA pol. (Phoneutria®)	5 UI/ μ l	1UI	0,2 μ l
H2O	-	-	8 μ l
Volume final de 14 microlitros: 12 μ l de MIX + 2 μ l de DNA (lisado) da amostra.			

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

Reagentes	Concentração	Concentração/tubo	Volume/tubo
PC03 (IDT ®)	10 pmol/ μ l	10 pmol	1 μ l
PC04 (IDT®)	10 pmol/ μ l	10 pmol	1 μ l
Tampão IB (Phoneutria®)	10x	1x	1 μ l
dNTP Mix (QuatroG®)	2,5 mM	200 μ M	0,8 μ l
Taq DNA pol. (Phoneutria®)	5 UI/ μ l	1UI	0,2 μ l
H2O	-	-	6 μ l
Volume final de 12 microlitros: 10 μ l de MIX + 2 μ l do produto da 1ª reação de amplificação de 268 pb.			

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

Passo	Temperatura	Tempo
1	95°C	5 minutos
2	94°C	1 minuto
3	55°C	1 minuto
4	72°C	1 minuto
5	39 vezes ao passo de 2 ao 4	-
6	72°C	10 minutos
7	4°C	10 minutos
8	FIM	-

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

Reagentes	Concentração	Concentração/tubo	Volume/tubo
MY09 (IDT ®)	10 pmol/µl	10 pmol	1 µl
MY11 (IDT®)	10 pmol/µl	10 pmol	1 µl
Tampão IB (Phoneutria®)	10x	1x	1 µl
dNTP Mix (QuatroG®)	2,5 Mm	200 µM	0,8 µl
Taq DNA pol. (Phoneutria®)	5 UI/µl	1UI	0,2 µl
H2O	-	-	7 µl
Volume final de 13 microlitros: 11 µl de MIX + 2 µl de DNA (lisado) da amostra.			

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

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

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

Reagentes	Concentração	Concentração/tubo	Volume/tubo
GP5+ (IDT ®)	10 pmol/µl	10 pmol	1 µl
GP6+ (IDT®)	10 pmol/µl	10 pmol	1 µl
Tampão IB (Phoneutria®)	10x	1x	1 µl
dNTP Mix (QuatroG®)	2,5 mM	200 µM	0,8 µl
Taq DNA pol. (Phoneutria®)	5 UI/µl	1UI	0,2 µl
H2O	-	-	6 µl
Volume final de 12 microlitros: 10 µl de MIX + 2 µl do produto da 1ª reação de amplificação de 450 pb.			

Quadro 7 – Programa de amplificação do fragmento de 150 pb do genoma viral

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

Quadro 8 - Componentes do Mix de PCR para amplificação de um fragmento de 150 pb do genoma viral

Reagentes	Concentração	Concentração/tubo	Volume/tubo
GP5+ (IDT ®)	10 pmol/µl	10 pmol	4,17 µl
GP6+ (IDT®)	10 pmol/µl	10 pmol	4,17 µl
Tampão IB (Phoneutria®)	10x	1x	4,17 µl
dNTP Mix (QuatroG®)	2,5 mM	200 µM	3,33 µl
Taq DNA pol. (Phoneutria®)	5 UI/µl	1UI	0,83 µl
H2O	-	-	25 µl
Volume final de 50 microlitros: 41,67 µl de MIX + 8,33 µl do produto da 1ª reação de amplificação de 450 pb.			

Quadro 8 - Componentes do Mix de PCR para amplificação de um fragmento de 150 pb do genoma viral

Reagentes	Concentração	Concentração/tubo	Volume/tubo
GP5+ (IDT ®)	10 pmol/µl	10 pmol	4,17 µl
GP6+ (IDT®)	10 pmol/µl	10 pmol	4,17 µl
Tampão IB (Phoneutria®)	10x	1x	4,17 µl
dNTP Mix (QuatroG®)	2,5 mM	200 µM	3,33 µl
Taq DNA pol. (Phoneutria®)	5 UI/µl	1UI	0,83 µl
H2O	-	-	25 µl
Volume final de 50 microlitros: 41,67 µl de MIX + 8,33 µl do produto da 1ª reação de amplificação de 450 pb.			

Quadro 9 – Programa de Amplificação para o Sequenciamento do fragmento de 150 pb do genoma viral

Passo	Temperatura	Tempo
1	96°C	1 minuto
2	96°C	15 segundos
3	34 vezes o passo de 2	1 minuto
4	50°C	15 segundos
5	60°C	4 minutos
6	FIM	-