



**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

TESE DE DOUTORADO

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA RAP1 COMO BIOMARCADOR
DA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL ASSOCIADA À
INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)**

MARCELO ANTONIO PASCOAL XAVIER

**BELO HORIZONTE
2011**

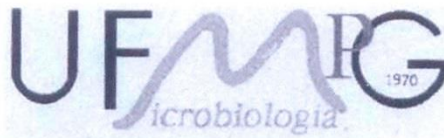
MARCELO ANTONIO PASCOAL XAVIER

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA RAP1 COMO BIOMARCADOR
DA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL ASSOCIADA À
INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Paulo César Peregrino Ferreira
Co-orientadora: Dra. Jaqueline Germano de Oliveira

**BELO HORIZONTE
2011**



**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

ALUNO: MARCELO ANTÔNIO PASCOAL XAVIER Nº matrícula: 2008720050

Programa de Pós-graduação em Microbiologia - NÍVEL DOUTORADO

Defesa de Tese: 18 de maio de 2011

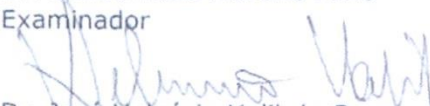
Título: "Caracterização da proteína Rap1 como biomarcador da neoplasia intraepitelial cervical associada à Infecção por Papilomavírus Humano (HPV)"

Co-orientadora: Dra. Jaqueline Germano de Oliveira

A Tese foi submetida à apreciação da Profa. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli que emitiu parecer favorável.


Dr. Olindo Assis Martins Filho
Examinador

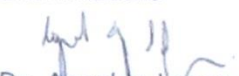
Aprovado: *sim*


Dr. José Helvécio Kalil de Souza
Examinador

Aprovado: *sim*


Dra. Mônica Maria Demas Álvares Cabral
Examinadora

Aprovado: *MD*


Dr. Agnaldo Lopes da Silva Filho
Examinador

Aprovado: *sim*


Prof. Paulo César Peregrino Ferreira
Orientador

Aprovado: *sim*


Prof. Cláudio Antônio Bonjardim
Coordenador

Aos meus grandes amores: Joventina, Vanessa, Laura e Osvaldo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

À minha mãe, Joventina, pela proteção.

À Vanessa pelo apoio incondicional e decisivo.

À Laura pela compreensão e apoio.

Ao Osvaldo pelo quase entendimento.

Ao Prof. Paulo pela confiança, liberdade, ensinamento e orientação profissional.

À Dra. Jaqueline pela acolhida, experiência, decisão e orientação científica.

À Dra. Luciana Gomes, pela preciosa colaboração e co-orientação.

Aos Profs. Cláudio e Erna pelo exemplo, incentivo e aprendizagem.

À Profa. Lúcia, Lurdinha, Margarete e Cristina por toda a imuno-histoquímica.

Ao pessoal do Laboratório de Anatomia Patológica do HC da UFMG pela colaboração.

Ao pessoal do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ pela colaboração.

À Clari, pela amizade.

À Anna Carolina, pela grande ajuda nos experimentos.

Ao pessoal do Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ pela colaboração, oportunidade e discussões metodológica e estatística.

Ao pessoal do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ pela colaboração.

As colegas Thais Almeida, Fabiana Rocha e Letícia Marques pela essencial ajuda molecular.

Aos colegas da Pós-Graduação e do Laboratório de Vírus pelo entusiasmo.

À Ângela, Douglas e Fátima pela constante atenção.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG.

*Alguns veem as coisas como são e perguntam “por quê?”
Eu as vejo como nunca foram e pergunto “por que não?”*

George Bernard Shaw

RESUMO

RAP1 (RAS proximate 1), uma pequena proteína GTPase da superfamília RAS, é um presumido oncogene altamente expresso em várias linhagens de células malignas e tipos de câncer, incluindo alguns tipos de carcinoma de células escamosas (CCE). No entanto, a participação de RAP1 na carcinogênese cervical iniciada pelo Papilomavírus humano (HPV) é desconhecida. Realizamos um estudo transversal de biópsias do colo uterino armazenadas em parafina para determinar a associação de RAP1 com a neoplasia intraepitelial cervical (NIC). A detecção e a genotipagem do HPV foram realizadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) *nested* e a carga viral por PCR em tempo real dos mRNAs das oncoproteínas E6 e E7. Avaliações qualitativa e quantitativa das expressões imuno-histoquímicas de RAP1, RAP1 GAP, p16^{INK4A} (p16) e Ki67 em tecido fixo foram realizadas em 319 biópsias cervicais armazenadas em parafina e classificadas como mucosa normal ou não-displásicas (MND) (n = 65); NIC grau 1 (n = 102), NIC de grau 2/3 (n = 85) e CCE (n = 67). Quantificação da expressão gênica de RAP1A, RAP1B e p16 foi feita por PCR em tempo real. O DNA do HPV foi detectado em 56,73% das amostras de todos os grupos, principalmente NIC 2/3 (68,42%) e CCE (75,00%). Foi observado um aumento gradual nas expressões de RAP1, RAP1 GAP, p16 e Ki67 nos grupos MND <NIC 1 <NIC 2/3 (p <0,001). Especificamente, um aumento progressivo dos níveis de expressão RAP1 aumentou em 3,5 vezes o risco de NIC 1 [odds ratio (OR) = 3,50; intervalo de confiança (IC) de 95%: 1,30-10,64] e em quase 20 vezes o risco de CIN 2/3 (OR = 19,86, IC de 95%: 6,40-70,79), quando comparados com MND. Além disso, a análise de regressão logística ordinal estereotípica mostrou que este aumento progressivo na expressão RAP1 impacta mais fortemente em NIC 2/3 do que em NIC 1. Comparada aos grupos NIC 1 e NIC 2/3, também foi observada menor expressão gênica relativa de RAP1A no grupo CCE (p <0,05). Não foram encontradas diferenças na RAP1B expressão gênica relativa e p16. Assim, os nossos resultados sugerem que RAP1 pode ser um biomarcador útil para o diagnóstico de CIN.

ABSTRACT

RAP1 (RAS proximate 1), a small GTP-binding protein of the RAS superfamily, is a putative oncogene that is highly expressed in several malignant cell lines and types of cancers, including some types of squamous cell carcinoma (SCC). However, the participation of RAP1 in cervical carcinogenesis initiated by *Human papillomavirus* (HPV) is unknown. We conducted a cross-sectional study of paraffin embedded cervical biopsies to determine the association of RAP1 with cervical intraepithelial neoplasia (CIN). HPV detection and genotyping were performed by nested polymerase chain reaction (PCR) and viral load by real-time PCR of E6 and E7 oncoproteins mRNAs. Standard and quantitative immunohistochemistry assessment of RAP1, RAP1 GAP, p16^{INK4A} (p16) and Ki67 expressions in fixed tissue were performed on 319 paraffin-embedded cervical biopsies that were classified as normal or non-dysplastic mucosa (NDM) (n = 65); CIN grade 1 (n = 102), CIN grade 2/3 (n = 85), and SCC (n=67). RAP1A, RAP1B and p16 gene expression quantification was performed by real-time PCR. HPV DNA was detected in 56.73% of the samples in all groups, mainly CIN 2/3 (68.42%) and SCC (75.00%). A gradual increase in RAP1, RAP1 GAP, p16 and Ki67 expressions in NDM < CIN 1 < CIN 2/3 (p<0.001) specimens was observed. Specifically, a progressive increase in the RAP1 expression levels increased the risk of CIN 1 [odds ratio (OR) = 3.50; 95% confidence interval (CI) 1.30-10.64] 3.5 fold and the risk of CIN 2/3 (OR=19.86, 95% CI 6.40-70.79) nearly 20 fold when compared to NDM. In addition, stereotype ordinal logistic regression analysis showed that this progressive increase in RAP1 expression more strongly affected CIN 2/3 than CIN 1. Compared to CIN 1 and CIN 2/3 groups, it also observed lower relative gene expression RAP1A in the SCC group (p <0.05). We found no differences in the relative gene expression RAP1B and p16. Thus, our findings suggest that RAP1 may be a useful biomarker for the diagnosis of CIN.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	Plano geral do estudo	25
FIGURA 2 -	Micrografia e microscopia de papilomavírus	28
FIGURA 3 -	Modelo de organização do genoma do HPV16	30
FIGURA 4 -	Organização do ciclo biológico do HPV durante a infecção produtiva	32
FIGURA 5 -	Anatomia e histologia funcionais do útero	37
FIGURA 6 -	História natural da infecção genital por HPV	41
FIGURA 7 -	Mucosa ectocervical normal e com NIC 1	43
FIGURA 8 -	Mucosa ectocervical com NIC 2/3	44
FIGURA 9 -	Algoritmo para o diagnóstico da neoplasia cervical	46
FIGURA 10 -	Acurácia dos testes DNA-HPV e Papanicolaou para o diagnóstico da neoplasia cervical	50
FIGURA 11 -	Funções biológicas e regulação da proteína RAP1	54
FIGURA 12 -	Delineamento metodológico do estudo	58
FIGURA 13 -	Parâmetros imuno-histoquímicos da primeira classificação da expressão de p16 nos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3	62
FIGURA 14 -	Parâmetros imuno-histoquímicos da segunda classificação da expressão de p16 nos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3	63
FIGURA 15 -	Parâmetros imuno-histoquímicos da segunda classificação da expressão de Ki67 nos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3	64
FIGURA 16 -	Parâmetros imuno-histoquímicos da classificação da expressão de p16 no grupo CCE	65
FIGURA 17 -	Distribuição da frequência do número de amostras do colo uterino selecionadas para o estudo por Estados brasileiros	80
FIGURA 18 -	Imuno-histoquímica de RAP1 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3	101
FIGURA 19 -	Imuno-histoquímica de RAP1 GAP nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3	103
FIGURA 20 -	Imuno-histoquímica de p16 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3	105
FIGURA 21 -	Localização intracelular das proteínas RAP1 e p16 em amostras do grupo NIC 2/3	108
FIGURA 22 -	Imuno-histoquímica para RAP1 (A) e p16 (B) segundo o diagnóstico morfológico de CCE	109
FIGURA 23 -	Modelo de desregulação da proteína RAP1 na neoplasia intraepitelial cervical associada à infecção por HPV	132

GRÁFICO 1 -	Gráfico do tipo <i>boxplot</i> da quantificação da carga viral do HPV16 e do HPV18 em amostras grupos NIC 1, NIC 2/3 e CCE	83
GRÁFICO 2 -	Gráficos do tipo <i>boxplot</i> da quantificação da expressão do mRNA do HPV16 e do HPV18 em amostras grupos NIC 1, NIC 2/3 e CCE	84
GRÁFICO 3 -	Níveis categorizados de expressão dos biomarcadores RAP1, RAP1 GAP, p16 e Ki67 na segunda classificação imuno-histoquímica	98
GRÁFICO 4 -	Associação entre a presença do HPV e o imunofenótipo dos biomarcadores RAP1, RAP1 GAP, p16 e Ki67 nos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3	99
GRÁFICO 5 -	Intensidade relativa (RI) da expressão de RAP1 e p16 nos grupos MND, CIN 1 e CIN 2/3	113
GRÁFICO 6 -	Intensidade relativa (RI) da expressão de RAP1 e p16 nos grupos MND, CIN 1 e CIN 2/3 estratificada pelo resultado da detecção do HPV por PCR	114
GRÁFICO 7 -	Correlação das intensidades relativas (RI) de expressão das proteínas RAP1 e p16 nos grupos MND, CIN 1 e CIN 2/3.	115
GRÁFICO 8 -	Expressão gênica relativa das proteínas RAP1A, RAP1B e p16, nos grupos NIC 1, NIC 2/3 e CCE, pelo método Delta-Delta CT	116
GRÁFICO 9 -	Expressão gênica relativa das proteínas RAP1A, RAP1B e p16, nos grupos NIC 1, NIC 2/3 e CCE, pelo método rER	118
GRÁFICO10-	Análise de correlação da expressão gênica relativa de RAP1A, RAP1B e p16, pelos métodos Delta-Delta CT e rER, entre os grupos NIC1, NIC2/3 e CCE	120

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Iniciadores utilizados na nested-PCR para genotipagem do HPV	69
TABELA 2 -	Iniciadores utilizados na qPCR para quantificação de mRNA celular	73
TABELA 3 -	Iniciadores utilizados na qPCR para quantificação de mRNA e DNA viral	75
TABELA 4 -	Testes estatísticos utilizados no estudo	77
TABELA 5 -	Detecção do DNA do HPV por <i>nested</i> PCR nas amostras dos grupos MND, NIC 1, NIC 2/3 e CCE	81
TABELA 6 -	Genotipagem do HPV nas amostras dos grupos MND, NIC 1, NIC 2/3 e CCE por PCR específica, sequenciamento direto e qPCR	82
TABELA 7 -	Primeira classificação imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3	85
TABELA 8 -	Primeira classificação imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 GAP nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3	87
TABELA 9 -	Primeira classificação imuno-histoquímica do biomarcador p16 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3	89
TABELA 10 -	Segunda classificação imuno-histoquímica dos biomarcadores RAP1, RAP GAP, p16 e Ki67 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3	93
TABELA 11 -	Categorização da segunda classificação imuno-histoquímica dos biomarcadores RAP1, RAP GAP, p16 e Ki67 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3	96
TABELA 12 -	Localização celular dos biomarcadores RAP1, RAP GAP e p16 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3	107
TABELA 13 -	Classificação imuno-histoquímica dos biomarcadores RAP1 e p16 nas amostras do grupo CCE	109
TABELA 14 -	Coeficientes e interceptos do modelo de regressão logística	110
TABELA 15 -	Valores estimados de probabilidade para diferentes categorias da variável resposta	112
TABELA 16 -	<i>Odds ratio</i> (OR) para as associações entre RAP1 e o risco de NIC e CCE	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\Delta C_T$	Delta delta C_T
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micro molar
A	Absorbância
AgNO_3	Nitrato de prata
AIC	<i>Akaike information criterion</i>
ANOVA	Análises de variâncias
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Célula apresentadora de antígeno
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BPV	<i>Bovine papillomavirus</i>
C3G	Fator permutador do nucleotídeo guanina C3G
CaIDAG	Domínios ligadores de cálcio e diacilglicerol
CCE	Carcinoma cervical escamoso invasor
CD	Grupamento de diferenciação
cDNA	DNA complementar
COEP	Comitê de Ética e Pesquisa
C_T	Ciclo <i>threshold</i>
DAB	Diamino-benzidina
DEPC	Dimetilpirocarbonato
DOCK-4	Proteína DOCK 4
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados

E6AP	Proteína associada a E6
E6TP	Proteína 1 alvo de E6
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EGF	Fator de crescimento epitelial
Epac	Fator permutador do nucleotídeo guanina de RAP1
F	Foward
GAP	Proteínas ativadoras de GTPase
GAPDH	Gliceraldaído-3-fosfato-desidrogenase
GDP	Guanina difosfato
GEF	Fatores permutadores do nucleotídeo guanina
GP	Glicoproteína
GTP	Guanina trifosfato
GTPase	Proteína ativadora da ligação do nucleotídeo guanina
HCl	Ácido clorídrico
HEK	Linhagem de células HEK
HGF	Fator de crescimento dos hepatócitos
HPV	<i>Human papillomavirus</i>
HR-HPV	Papilomavírus humano de alto risco
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IFN	Interferon
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INK4A	Inibidor de cinases dependente de ciclina 4 ^a
ISEC	Inflamação sem efeito citopático viral
MND	Mucosa cervical alterada por inflamação sem efeito citopático viral
KCl	Cloreto de potássio

LIEAG	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
LIEBG	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
LIS	Lesão intraepitelial escamosa
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Mil imolar
mRNA	RNA mensageiro
NaOH	Hidróxido de sódio
NFkB	Fator nuclear kB
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NK	<i>Natural Killer</i>
OR	<i>Odds ratio</i> ou razão de chances
p16	Proteína do gene 16
p53	Proteína do gene p53
P97	Promotor 97
P670	Promotor 670
PB	Pares de bases
PBS	Solução tampão salina de fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDZ	Domínio PDZ
PGDF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PV	Papilomavírus
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
R	Reverse

RAP1	Proteína 1 associada a RAS ou RAS proximate 1
RAPGAP	Proteína ativadora de GTPase Rap
RAS	Proteína RAS
RLP29	Proteína ribossomal 29
RNA	Ácido ribonucleico
SPA-1	Proteína associada à proliferação 1
SUS	Sistema Único de Saúde
TAE	Tampão ácido acético EDTA
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
Taq	Taq DNA polimerase
TCR	Receptor de células T
Tm	<i>Temperature melting</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta
V	Volt
VLP	Partículas semelhantes ao vírus
USA	<i>United State America</i>

SUMÁRIO

1 -	INTRODUÇÃO	18
1.1 -	Relevância e justificativa	19
1.2 -	Problema e hipótese	22
1.3 -	Objetivos	23
1.3.1 -	Objetivo geral	23
1.3.2 -	Objetivos específicos	23
1.4 -	Plano geral do estudo	24
2 -	REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1 -	Histórico da associação entre papilomavírus e câncer genital	27
2.2 -	Papilomavírus	27
2.2.1 -	Propriedades gerais dos papilomavírus	27
2.2.2 -	Classificação dos papilomavírus	28
2.3 -	<i>Human papillomavirus</i> - HPV	29
2.3.1 -	Estrutura e organização do genoma	29
2.3.2 -	Ciclo biológico	31
2.3.3 -	Proteínas regulatórias virais E1 e E2	33
2.3.4 -	Proteínas virais E4, L1 e L2	34
2.3.5 -	Oncoproteínas virais E5, E6 e E7	34
2.4 -	História natural da infecção genital pelo HPV e neoplasia cervical	36
2.4.1 -	Anatomia funcional do colo uterino	36
2.4.2 -	Epidemiologia da infecção genital pelo HPV e neoplasia cervical	37
2.4.3 -	Transmissão e fatores de risco para a infecção genital pelo HPV	38
2.4.4 -	Resposta imune à infecção genital pelo HPV	39
2.4.5 -	Persistência da infecção versus <i>clearence</i> viral	40
2.4.6 -	Progressão da infecção para neoplasia intraepitelial cervical	41
2.5 -	Neoplasia intraepitelial cervical	42
2.5.1 -	Diagnóstico da neoplasia intraepitelial cervical	44
2.5.2 -	Prevenção da neoplasia intraepitelial cervical	47
2.5.2.1 -	Prevenção primária da infecção pelo HPV	47
2.5.2.2 -	Rastreamento da neoplasia intraepitelial cervical	48
2.5.3 -	Aplicação clínica de biomarcadores na neoplasia intraepitelial cervical	50

2.6 -	Proteína RAP1	52
2.6.1 -	Regulação da sinalização RAP1	52
2.6.2 -	Funções biológicas de RAP1	53
2.6.3 -	RAP1 e carcinogênese	55
3 -	METODOLOGIA	56
3.1 -	Aspectos éticos	57
3.2 -	Amostras teciduais	57
3.3 -	Critérios de inclusão e exclusão	59
3.4 -	Revisão e classificação das amostras	59
3.5 -	Imuno-histoquímica	60
3.5.1 -	Reação de imuno-histoquímica	60
3.5.2 -	Parâmetros de classificação	61
3.5.2.1 -	Avaliação óptica	61
3.5.2.2 -	Morfometria	66
3.6 -	Reação em cadeia da polimerase	66
3.6.1 -	Desparafinação e extração de DNA	66
3.6.2 -	Verificação da presença de inibidores	66
3.6.3 -	Detecção do DNA viral nas amostras por <i>nested</i> -PCR	67
3.6.4 -	Genotipagem com iniciadores específicos	69
3.6.5 -	Genotipagem por sequenciamento direto dos fragmentos do gene L1	69
3.7 -	Transcrição reversa e reação quantitativa em tempo real	70
3.7.1 -	Desparafinação e extração de RNA	70
3.7.2 -	Reação de transcrição reversa	71
3.7.3 -	Seleção e controle de qualidade <i>in silico</i> dos iniciadores	71
3.7.4 -	Otimização das reações quantitativas em tempo real	72
3.7.5 -	Validação da eficiência de amplificação dos genes alvos e dos controles endógenos	72
3.7.6 -	Quantificação relativa da expressão de genes alvos celulares	73
3.7.7 -	Quantificações absoluta da carga viral e relativa da expressão dos genes alvos virais E6 e E7 do HPV16 e do HPV18	74
3.7.8 -	Construção da curva padrão para quantificação absoluta	74
3.7.9 -	Quantificação absoluta da carga viral e quantificação relativa da expressão dos mRNAs virais E6 e E7 do HPV16 e do HPV18	75

3.8 -	Análises estatísticas	76
4 -	RESULTADOS	79
4.1 -	Dados Demográficos	80
4.2 -	Detecção e genotipagem do HPV	80
4.3 -	Carga viral e expressão gênica do HPV16 e do HPV18	82
4.4 -	Imuno-histoquímica	85
4.4.1 -	Descrição morfológica das classificações imuno-histoquímicas	85
4.4.2 -	Modelo de regressão logística ordinal da imuno-histoquímica	110
4.5 -	Morfometria	113
4.6 -	Expressão gênica das proteínas RAP1A, RAP1B e p16	116
5 -	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	123
6 -	CONCLUSÃO	134
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
	ANEXOS	150
	Anexo 1: Comprovante CEP – CONEP	151
	Anexo 2: Eficiências das qPCR dos alvos celulares	152
	Anexo 3: Validação para cálculo Delta-Delta CT ($\Delta\Delta CT$)	153
	Anexo 4: Eficiência das qPCR dos alvos virais (DNA)	154
	Anexo 5: Eficiência das qPCR dos alvos virais (cDNA)	155
	ARTIGO ORIGINAL	156

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Relevância e justificativa

O câncer do colo uterino ou cervical continua uma das neoplasias mais comuns em mulheres no mundo e no Brasil, apesar da ampla disponibilidade de métodos para o rastreamento da sua lesão precursora, a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) ou do seu fator etiológico, o *Human papillomavirus* ou papilomavírus humano (HPV) (Lozano *et al.*, 2012). O rastreamento, identificação da doença assintomática, é a base para a prevenção do estágio final do câncer invasor e é realizado por meio de análises subjetivas citológica, colposcópica e histopatológica das alterações morfológicas epiteliais induzidas pelo HPV. Entretanto, esses exames geram elevadas taxas de resultados falso negativo e falso positivo, além de grande variabilidade interobservador, o que prejudica a decisão clínica sobre o tratamento. Portanto, é imprescindível a busca por biomarcadores capazes de indicar, com precisão, o significado das alterações decorrentes da progressão da NIC, bem como distinguir a infecção viral produtiva, predominante na lesão intraepitelial de baixo grau (LIEBG) e não associada diretamente à transformação neoplásica, denominada NIC 1, da infecção não produtiva, predominante na lesão intraepitelial de alto grau (LIEAG), com integração do genoma viral ao genoma celular e diretamente associada à transformação neoplásica, denominada NIC 2/3.

Desde a introdução do teste citológico de Papanicolaou, na década de 1940, houve uma significativa queda na incidência e na mortalidade por câncer cervical. Contudo, o desempenho do teste de Papanicolaou é severamente prejudicado por elevadas variabilidades inter e intraobservador e altas taxas de resultados falso negativo e falso positivo, respectivamente entre 20-30% e 50-70%. As recentes inovações técnicas do teste de Papanicolaou, como a citologia em meio líquido (CML), não melhoraram a sensibilidade e a especificidade para a detecção da NIC em relação à citologia convencional (Tsoumpou *et al.*, 2009). Além disso, a análise histopatológica de biópsias do colo uterino direcionadas por colposcopia, consideradas padrão-ouro para o diagnóstico de NIC, apresenta grande variabilidade de interpretação interobservador culminando em erros na determinação do grau da NIC, surpreendentemente em 30-50% dos casos (Schiffman *et al.*, 2007; Tsoumpou *et al.*, 2009; Schiffman *et al.*, 2011).

A recente disponibilidade de testes moleculares para detectar a presença do DNA do HPV em amostras cervicais, conhecidos como testes DNA-HPV,

aumentaram a expectativa de melhorias no rastreamento da neoplasia cervical. Alguns desses métodos, incluindo a captura híbrida e reação em cadeia da polimerase (PCR) para HPV, demonstraram, após estudos de validação clínica, bons resultados. Estes resultados permitiriam a incorporação dos testes DNA-HPV ao algoritmo convencional de rastreamento, como adjunto da citologia cervical, ou, até mesmo, a substituição dos métodos tradicionais. No entanto, os testes moleculares para detecção de HPV também falham na triagem de NIC 1, não permitem a distinção entre infecção transitória e infecção crônica ou persistente e apresentam grande variabilidade nas estimativas de sensibilidade e especificidade, com médias de 84% (55-100%) e 77% (31%-96%), respectivamente (Caetano *et al.*, 2006; Tsoumpou *et al.*, 2009; Schiffman *et al.*, 2011).

Pesquisas focadas na identificação e desenvolvimento de biomarcadores para a NIC revelaram, dentre outros, a proteína supressora de tumor p16^{INK4A} (p16) como um promissor biomarcador. A proteína p16, inibidora da atividade de cinases dependentes de ciclina (CDK) 4 e 6, encontra-se hiperexpressa no epitélio infectado por HPV. A superexpressão decorre da ação intracelular da oncoproteína viral E7 que, ao degradar a proteína do retinoblastoma (pRb), promove a liberação do fator de transcrição E2F e, conseqüentemente, a progressão do ciclo celular. A liberação do E2F nas células normais, conseqüência da fosforilação da pRb por CDK4 e CDK6, é o principal estímulo para síntese da p16. Entretanto, apesar de estar hiperexpressa nas células infectadas por HPV, a p16 é funcionalmente inativa (Schiffman *et al.*, 2007; Tsoumpou *et al.*, 2009).

A utilização da imuno-histoquímica, imunorreação enzimática complementar ao exame histopatológico, para a avaliação da expressão da p16 nas células epiteliais tem se mostrado muito valiosa na redução da variabilidade interobservador do diagnóstico de lesões cervicais, particularmente no diagnóstico da NIC 2/3. Entretanto, questões fundamentais para a avaliação clínica de biomarcadores, como falta de padronização na preparação das amostras para imuno-histoquímica e nos critérios para interpretação dos cortes histopatológicos, têm reduzido a reprodutibilidade do método e dificultado a interpretação dos dados de diferentes estudos. Por conseguinte, as evidências disponíveis ainda não permitem a formulação de recomendações definitivas sobre as aplicações da p16 na prática clínica (Tsoumpou *et al.*, 2009). Assim, a busca por biomarcadores de vias moleculares celulares sensíveis à ação de oncoproteínas virais torna-se essencial.

Neste cenário, a proteína RAP1 (*RAS proximate 1*), uma pequena GTPase da superfamília *RAS*, desponta como candidata a biomarcador da NIC e alvo antitumoral no câncer cervical. Membro da superfamília *RAS* de pequenas GTPases, RAP1 tem duas isoformas, RAP1A e RAP1B, com homologia de 95%, que são produtos de dois genes localizados nos cromossomos 1 e 12, respectivamente (Mitra *et al.*, 2003; Lafuente *et al.*, 2007). RAP1 funciona como transdutor bioquímico que regula o crescimento, diferenciação, sobrevivência e adesão das células eucariotas, alternando sua conformação entre uma forma inativa ligada ao GDP, RAP1-GDP, e uma forma ativa ligada ao GTP, RAP1-GTP (Farina *et al.*, 2004).

Importantes trabalhos demonstraram alterações na localização subcelular e na expressão do gene desta proteína em carcinomas de células escamosas, o tipo histológico mais comum do câncer cervical, e especularam sobre sua ação no controle do crescimento e da diferenciação de células epiteliais (D'silva *et al.*, 2003; Mitra *et al.*, 2003). Outras pesquisas evidenciaram alterações quantitativas e funcionais de RAP1 decorrentes da degradação de suas proteínas inibidoras, como a E6TP1, pela oncoproteína viral E6, com alta correlação com transformação celular (Liao *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2003; Chakrabarti *et al.*, 2004).

Portanto, considerando-se os resultados dos trabalhos anteriores e deste estudo, constata-se que a proteína RAP1 preenche os principais critérios para um biomarcador com valor clínico potencial para o diagnóstico da NIC. Ela apresenta alterações quantitativas e funcionais com alta correlação com transformação celular epitelial, seja por ação direta da oncoproteína E6 do HPV ou pela disfunção da proteína SPA-1 decorrente da ação indireta do complexo E2-Brd4 (Singh *et al.*, 2003; Chakrabarti *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2010). Mais precisamente, no que se refere aos resultados deste estudo, a proteína RAP1 apresenta o mesmo padrão imuno-histoquímico da proteína p16 e suas duas isoformas, RAP1A e RAP1B, demonstram maior expressão gênica relativa nos diferentes estágios da neoplasia intraepitelial cervical. Em conjunto, essas investigações sugerem que RAP1 e sua via de sinalização intracelular podem desempenhar importante papel no câncer cervical associado ao HPV.

1.2 – Problema e hipótese

Certamente, muitas reflexões são necessárias sobre a inaceitável permanência do câncer cervical ou do colo uterino entre as neoplasias mais comuns em mulheres no mundo e no Brasil, apesar da ampla disponibilidade de métodos para o rastreamento da sua precursora neoplasia intraepitelial cervical ou do seu agente etiológico, o HPV.

No Brasil, o câncer do colo do útero é o terceiro mais incidente na população feminina brasileira, excetuando-se os casos de câncer de pele não melanoma. Impulsionado pelo Programa Viva Mulher, criado em 1996, o controle do câncer do colo do útero foi reafirmado como prioridade no plano de fortalecimento da rede de prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer, lançado pelo Ministério da Saúde, em 2011.

Considerando-se exclusivamente a questão relacionada ao diagnóstico precoce da lesão precursora do câncer do colo uterino, a NIC, em detrimento a outras fundamentais questões de ordem técnico-administrativa, como, por exemplo: definição do método, intervalo de rastreamento, meta de cobertura dos exames, infraestrutura assistencial, do sistema de informação para monitorar todo o processo de rastreamento, diretrizes de diagnóstico e tratamento estabelecidas, e outras essenciais questões de cunho social, econômico e cultural, identifica-se um problema: Há um biomarcador que indique, com precisão, o significado das alterações decorrentes da progressão da NIC e consiga distinguir a infecção viral produtiva, predominante na NIC 1 e não associada diretamente à transformação neoplásica, da infecção não produtiva, predominante na lesão NIC 2/3, com integração viral no genoma celular e diretamente associada à transformação neoplásica?

O desdobramento deste problema possibilita a construção de uma hipótese: A proteína RAP1 é um biomarcador com valor clínico potencial para identificação e distinção das lesões precursoras do câncer cervical, NIC 1 e NIC 2/3, associadas à infecção por HPV.

1.3 – Objetivos

1.3.1 – Objetivo geral

Caracterizar a proteína RAP1 como biomarcador da neoplasia intraepitelial cervical associada à infecção pelo HPV.

1.3.2 – Objetivos específicos

A) Detectar o DNA de HPV nas amostras pela *nested*-PCR.

B) Genotipar os HPV detectados nas amostras pela PCR tipo específico ou por sequenciamento direto.

C) Quantificar o mRNA dos oncogenes virais E6 e E7 nas amostras pela qPCR.

D) Comparar a expressão das proteínas RAP1, p16, Ki-67 e RAP1GAP nas amostras pela imuno-histoquímica.

E) Quantificar o mRNA dos genes RAP1A, RAP1B, p16 e RAP1GAP nas amostras pela qPCR.

1.4 – Plano geral do estudo

O plano geral do estudo foi delineado conforme a as etapas abaixo, que estão representadas na FIGURA 1:

1ª – Definição do período de observação, entre os anos de 2006 e 2010, e dos locais de obtenção das amostras, os laboratórios de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UFMG e do Instituto Hermes Pardini.

2ª – Seleção de amostras após cálculo amostral, considerando-se os valores máximos de prevalência dos diagnósticos citopatológicos e histopatológicos de neoplasia intraepitelial cervical e câncer do colo uterino divulgados na literatura.

3ª – Classificações qualitativa e quantitativa dos resultados de reações de imuno-histoquímica respectivamente por microscopia óptica convencional, segundo critérios de dois sistemas independentes, e por aferição da intensidade média de pixel de regiões de interesse das lâminas digitalizadas.

4ª – Realização de técnicas moleculares PCR e qPCR para detecção e genotipagem do HPV e para quantificação da expressão de mRNA dos genes de proteínas celulares e virais.

5ª – Realização das estatísticas descritiva e inferencial para interpretação dos dados, apresentação resultados e discussão.

6ª – Redação da tese.

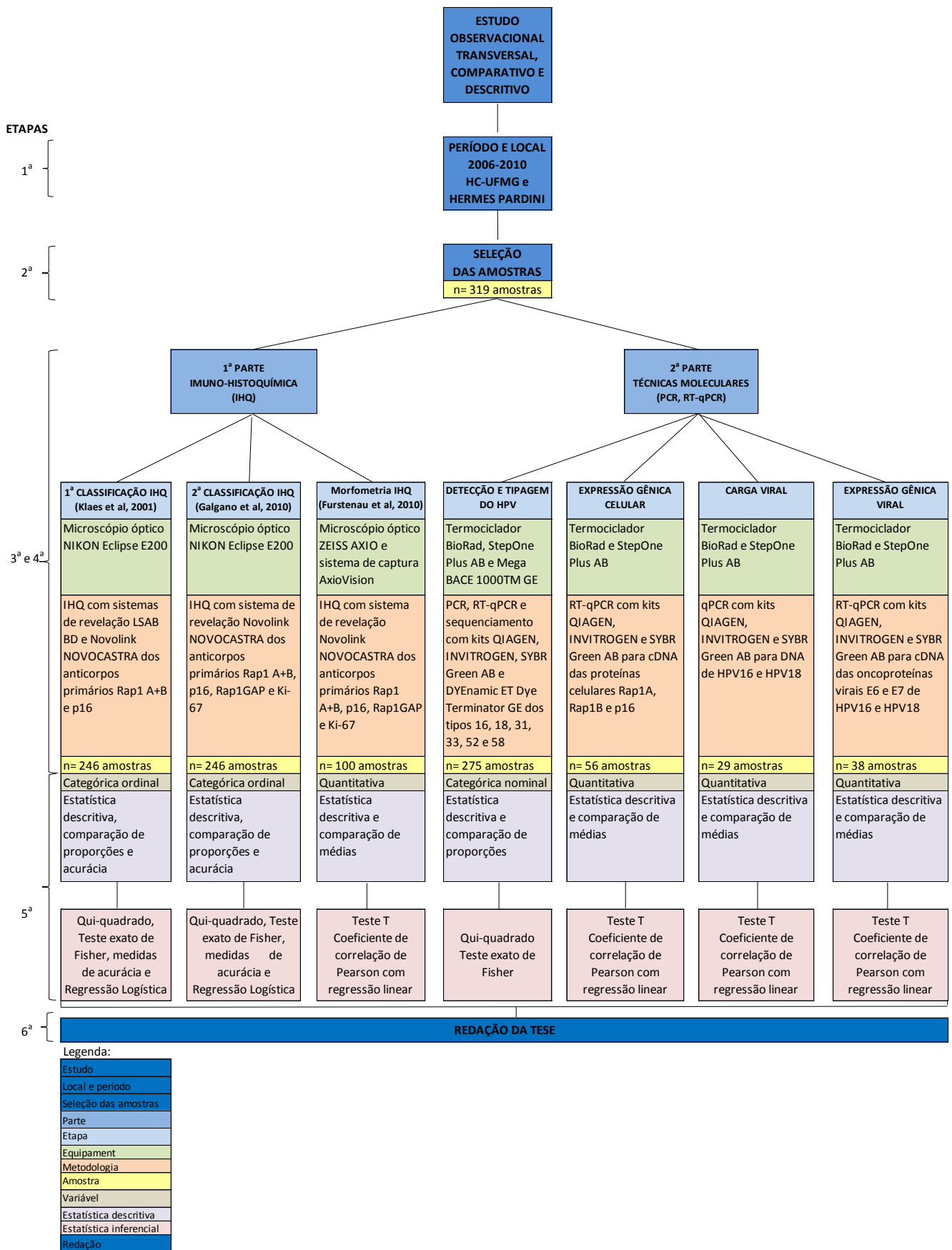


FIGURA 1 - Plano geral do estudo.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Histórico associação entre papilomavírus e câncer genital

Historicamente, a associação entre papilomavírus e câncer genital iniciou-se na década de 70. Entre 1974 e 1976, pesquisadores divulgaram os primeiros estudos sobre o papel do papilomavírus no desenvolvimento do câncer cervical. Em 1976, Meisels & Fortin publicaram trabalho descrevendo que o aparecimento de coilocitos em esfregaços cervicais indicava a infecção por papilomavírus. Eles também sugeriram a possibilidade de diferenciação das lesões “verrucosas” benignas, que não progrediam para câncer, das lesões precursoras que progrediam para câncer cervical (Meisels e Fortin, 1976). Estas ideias foram suportadas pela identificação de partículas de papilomavírus em lesões epiteliais iniciais do colo uterino e tornaram-se mais evidentes com a observação de papilomavírus em coilocitos de esfregaços cervicais. A ideia de uma lesão precursora viral foi confirmada pela identificação de partículas virais típicas em células displásicas das lesões precursoras do câncer do colo uterino. Os primeiros tipos de papilomavírus em humanos foram identificados diretamente de biópsias de câncer cervical entre 1983 e 1984 (Zur Hausen, 2002).

As análises dos papilomavírus, nos anos que se seguiram, nas tentativas de explicar a etiopatogênese do câncer cervical, levaram ao desenvolvimento do conhecimento sobre a biologia do vírus e a história natural da infecção e proporcionaram um levantamento epidemiológico da infecção. Muitos estudos epidemiológicos estão sendo realizados, objetivando o entendimento desse agente viral como fator de risco primário essencial para o desenvolvimento do câncer cervical. Grandes estudos epidemiológicos prospectivos e caso-controle suportam esta ideia e indicam o elevado risco da persistência da infecção por papilomavírus para o desenvolvimento do câncer cervical (Knipe *et al.*, 2001; Zur Hausen, 2002; Howley, 2006).

2.2 – Papilomavírus

2.2.1 – Propriedades gerais dos papilomavírus

Os papilomavírus (PV) são pequenos vírus de DNA fita dupla circular (episomal), não envelopados, que causam lesões epiteliais com variada severidade, desde lesões benignas à neoplasia invasora. As partículas infecciosas são compostas por genoma com 8000 pares de bases, aproximadamente, envolvidos por um capsídeo icosaédrico de 55 nm de diâmetro (FIGURA 2). Os PV infectam muitas espécies de vertebrados, mas são altamente espécie específicos. Cada tipo de PV apresenta tropismo por certo tipo de epitélio e é associado a um tipo particular de lesão. Atualmente, existem cerca de 200 genótipos de PV que infectam humanos, denominados *Human papillomavirus* (HPV) e identificados com base na homologia de sequências do DNA viral. Destes 200 genótipos de HPV, no mínimo 40 tipos exibem um tropismo para a mucosa genital (Mcmurray *et al.*, 2001; Sanclemente e Gill, 2002; Burd, 2003; Munoz *et al.*, 2006).

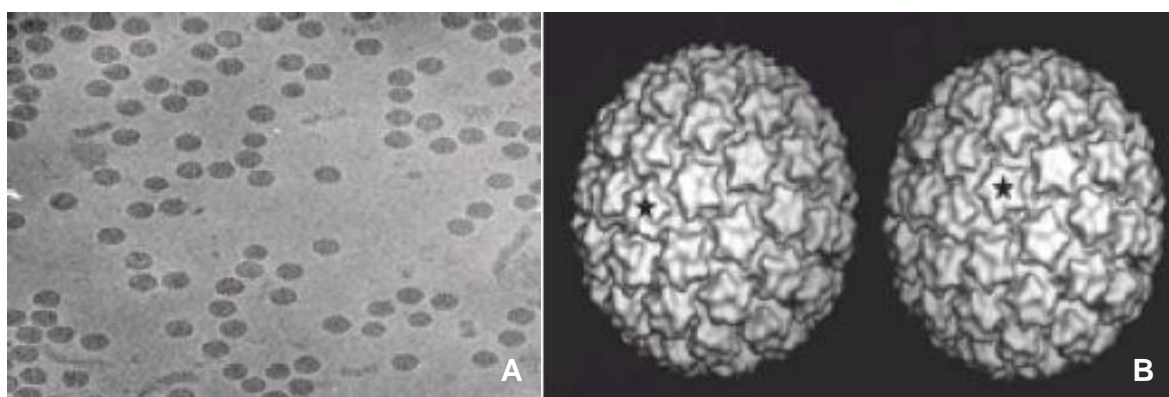


FIGURA 2 - Micrografia e microscopia de papilomavírus.

A) Micrografia eletrônica do BPV-1.

B) Microscopia crioelétrica de papilomavírus. (*) proteínas superficiais.

Fonte: Knipe *et al.*, 2001.

2.2.2 – Classificação dos papilomavírus

A família *Papillomaviridae* tornou-se oficialmente reconhecida pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) recentemente. Os PV são agrupados, atualmente, pela homologia entre sequências do gene L1, em gêneros, espécies, tipos, subtipos e variantes. Os gêneros demonstram homologia entre sequências do gene L1 inferior a 60%. Até o momento são conhecidos 16 gêneros que são identificados por letras do alfabeto grego. Cinco desses gêneros são compostos exclusivamente por PV que infectam humanos. O gênero clinicamente mais

importante é referido como *Alphapapillomavirus*. As espécies, dentro de um gênero, demonstram entre 60% e 70% de identidade entre sequências do gene L1 (De Villiers *et al.*, 2004).

Tipos de HPV são identificados por números na sequência histórica de sua descrição, por exemplo HPV-1, HPV-2, e demonstram diversidade da sequência de nucleotídeos do gene L1 superior a 10%. Diferenças entre 2% e 10% de homologia entre sequências do gene L1 definem um subtipo e diferenças menores que 2% uma variante (De Villiers *et al.*, 2004).

Doze tipos de alfa-papilomavírus foram classificados, por um estudo epidemiológico, como *Human papillomavirus* de alto risco (HR-HPV), devido a sua associação com carcinogênese cervical. Os HR-HPV são representados pelos tipos: HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-52, HPV-58, HPV-59, HPV-68 e HPV-67. O mesmo estudo identificou ainda dez tipos de alfa-papilomavírus (HPV-6, HPV-11, HPV-40, HPV-42, HPV-43, HPV-44, HPV-54, HPV-61, HPV-72 e HPV-81) como *Human papillomavirus* de baixo risco (LR-HPV) relacionados ao desenvolvimento de câncer cervical (Munoz *et al.*, 2003).

Os tipos de HPV de baixo risco mais comuns são HPV-6 e HPV-11. Os tipos de HPV de alto risco mais comuns são HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-45, encontrados em 80% dos casos de câncer cervical. O HPV-16 é o tipo mais prevalente e sozinho acomete cerca de 50% dos casos mundiais de carcinoma cervical invasor. O HPV-18 é o tipo mais prevalente nos casos de adenocarcinoma cervical (Bernard, 2005).

2.3 – *Human papillomavirus* - HPV

2.3.1 – Estrutura e organização do genoma

Todos os tipos de HPV contêm um genoma formado por DNA circular de fita dupla com aproximadamente 8000 pares de bases que pode ser dividido em três regiões: duas janelas de leitura, precoce e tardia, que codificam para proteínas precoces E1 a E7 e tardias L1 e L2, e uma região controladora longa (LCR), não codificadora (FIGURA 3). Essas três regiões em todos os tipos de HPV são

separadas por dois sítios de poliadenilação (pA): pA inicial ou precoce (P_E) e pA tardio (P_L) (Munoz *et al.*, 2006).

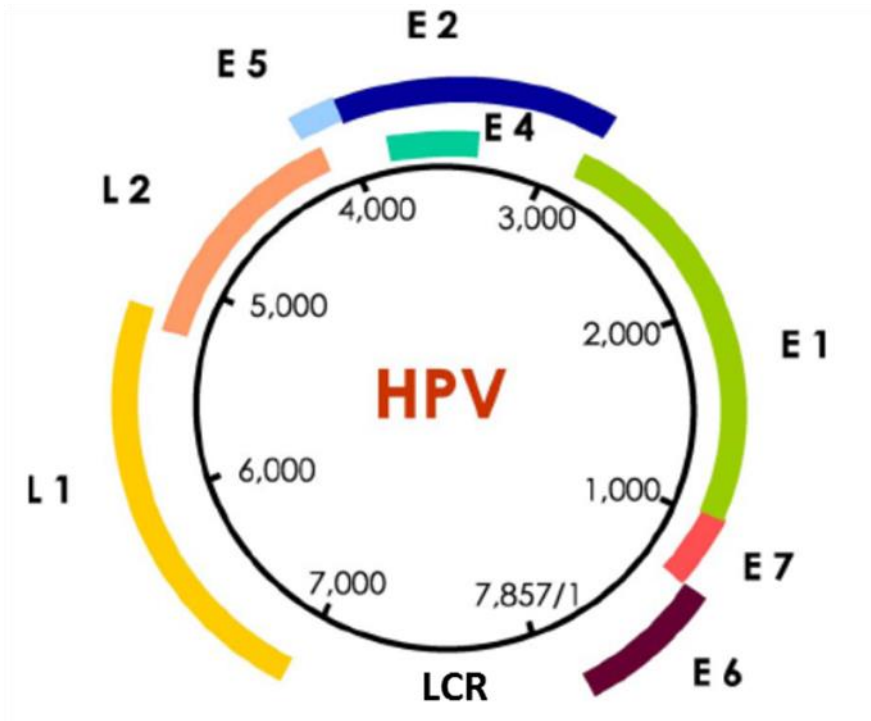


FIGURA 3 - Modelo da organização do genoma do HPV16. Os números dentro do círculo indicam as posições dos nucleotídeos. As regiões abertas para leitura precoce (E) e tardias (L) são representadas externamente.

Fonte: Munoz *et al.*, 2006.

A região precoce do HPV ocupa 50% do genoma viral na extremidade 5' e apresenta seis regiões abertas para leitura para transcrição e tradução de seis proteínas individuais: E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (Zheng e Baker, 2006).

A região tardia do HPV ocupa 40% do genoma viral e apresenta duas regiões abertas para leitura para transcrição e tradução das proteínas do capsídeo maior (L1) e menor (L2) (Zheng e Baker, 2006; Graham, 2010).

A região LCR, um segmento de 850 pares de bases (cerca de 10% do genoma do HPV), não tem função codificadora de proteína, mas sustenta a origem de replicação assim como local para ligação de múltiplos fatores de transcrição que são importantes na regulação da transcrição iniciada pela RNA polimerase II dos promotores virais precoces e tardios. O promotor precoce (P_E) ou promotor E6 (p97 no HPV-16, p99 no HPV-31) é muito potente e fortemente controlado. O promotor tardio (P_L) é ativado somente no ceratinócito diferenciado (Zheng e Baker, 2006).

A transcrição do genoma dos HPVs é complexa devido a presença de múltiplos promotores, vários padrões de processamentos do mRNA e produções de diferentes espécies de mRNA em diferentes células. A maioria dos transcritos do HPV inicia-se no promotor E6. O promotor E6 contém quatro elementos *cis* responsivos conservados (um local de ligação para o fator celular Sp1, dois locais de ligação para E2 e um local para ligação do fator de transcrição TFIID (Bernard, 2002; Zheng e Baker, 2006; Graham, 2010).

A ocupação alternada desses elementos responsivos no promotor E6, pelos seus respectivos ligantes, permite múltiplos níveis de atividade do promotor. Nas células epiteliais basais não diferenciadas, o sítio Sp1 é ocupado pelo fator celular Sp3 relacionado ao Sp1, que falha na ativação do promotor E6. Nas células epiteliais diferenciadas o promotor E6 é ativado por Sp1 juntamente com TFIID. Os transcritos que resultam deste evento codificam para o gene E2 e a proteína E2 traduzida pode ligar-se ao LCR, nos sítios de ligação E2, deslocando Sp1 e reduzindo a ação do promotor E6. Em altas concentrações, E2 pode também deslocar TFIID e reprimir mais eficientemente o promotor E6 (Bernard, 2002).

O promotor E6 do HPV tem somente uma moderada atividade e necessita de estimulação por amplificadores exclusivamente epiteliais para mais forte atividade. Recentemente, amplificadores epiteliais do promotor E6 do HPV têm sido bem determinados e incluem, principalmente, proteínas AP-1. As proteínas AP-1 constituem um grupo de fatores de transcrição composto por proteínas das famílias Fos (c-Fos) e Jun (c-Jun), que após a dimerização ligam-se às regiões promotoras e amplificadoras (Bernard, 2002; Milde-Langosch e Riethdorf, 2003; Graham, 2010).

2.3.2 – Ciclo biológico

A infecção por HPV requer o acesso da partícula infecciosa às células da camada basal epitelial, através de perda da integridade epitelial. Após a infecção e o desnudamento, o genoma viral é mantido na forma epissomal no núcleo das células basais, com um baixo número de cópias, pela ação da proteína E2 (Doorbar, 2005; Chow *et al.*, 2010; Bodily e Laimins, 2011).

No epitélio não infectado, as células basais deixam o ciclo celular após migração para a camada de células suprabasais e iniciam um processo de

diferenciação terminal. Durante a infecção por HPV, as proteínas precoces virais E6 e E7 expressas nas células basais mantém a progressão do ciclo celular e retardam a diferenciação terminal normal. A presença de E6 e E7 promove a característica retenção do núcleo celular em todas as camadas do epitélio infectado (Doorbar, 2005; Chow *et al.*, 2010; Bodily e Laimins, 2011).

A replicação do genoma viral inicia-se nas camadas epiteliais proliferativas basal e suprabasal, progride no estrato espinhoso e requer a expressão das proteínas precoces virais E4 e E5 e das proteínas tardias virais L1 e L2, responsáveis pela montagem do capsômero e síntese da partícula viral, nas camadas superiores do epitélio escamoso (Doorbar, 2005) (FIGURA 4). Posteriormente, as células epiteliais repletas de partículas virais no citoplasma são descamadas para a superfície.

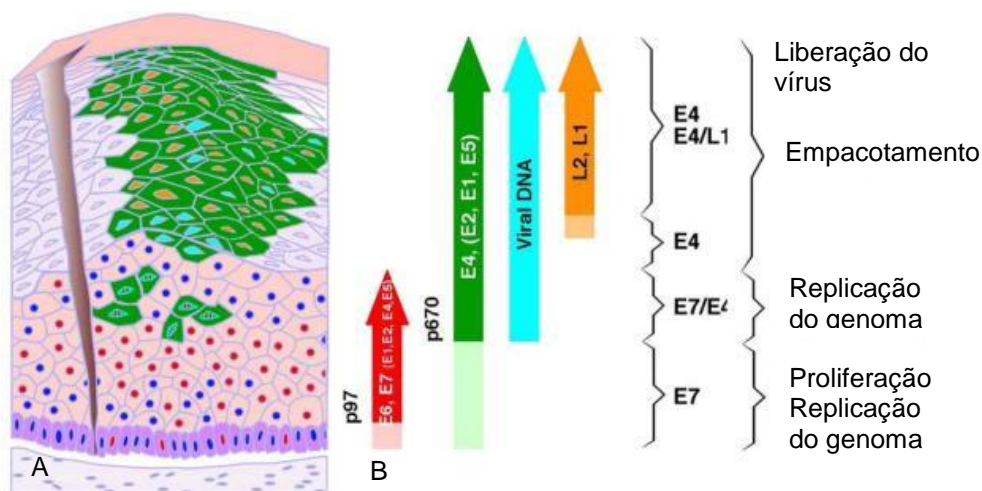


FIGURA 4 - Organização do ciclo biológico do HPV durante infecção produtiva. A - Representação da mucosa escamosa com solução de continuidade epitelial da superfície até a camada de células basais (ilúas). Durante infecção produtiva por HPV, as células mais superficiais do epitélio acumulam partículas virais no citoplasma (verde). B - Expressão gênica do HPV-16. Após a infecção, há a ativação do promotor p97 que promove expressão das oncoproteínas E6 e E7 (seta vermelha). Há também síntese das proteínas E2, que modula a expressão de E6 e E7. Nas camadas mais diferenciadas do epitélio, há a ativação do promotor p670, que induz a síntese das proteínas de replicação, montagem e empacotamento do vírus (setas verde e laranja). As partículas virais acumulam-se no citoplasma das células (seta azul). As células epiteliais repletas de partículas virais no citoplasma são descamadas para a superfície.

Fonte: Doorbar, 2005. (Houve alteração na ilustração, para fins didáticos).

2.3.3 – Proteínas reguladoras virais E1 e E2

As proteínas E1 e E2 formam um complexo que se liga à sequência nucleotídeos na origem de replicação viral e agem recrutando polimerases celulares e proteínas acessórias para mediar a replicação viral.

A proteína E1 tem 68 kDa, aproximadamente, e é expressa em baixos níveis nas células infectadas pelo HPV. E1 age na origem de reconhecimento e exibe tanto atividade de ATPase quanto de helicase, separando as fitas do DNA viral. Ela reconhece sequências ricas AT na origem de replicação do HPV, que estão localizadas próximas ao local de início da transcrição precoce. E1 forma hexâmeros que têm alta afinidade pelo DNA. E1 também se liga à DNA polimerase α e ajuda a recrutar complexos de replicação celulares para a origem de replicação viral. E1 interage com ciclinas A e E, e estas podem agir regulando a atividade de E1 (Wilson *et al.*, 2002).

A proteína E2 é multifuncional, participando da replicação do DNA viral, expressão gênica e segregação do genoma. Na forma de dímero, funciona como ativador ou repressor da transcrição viral, dependendo da sua concentração nuclear. A proteína E2 tem 50 kDa, aproximadamente, e possui dois domínios funcionais ligados por uma região altamente flexível (Blachon *et al.*, 2005; Clower *et al.*, 2006; Gammoh *et al.*, 2006; Hooley *et al.*, 2006; Narahari *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2006; You, 2010).

Um dos domínios liga-se, especificamente, ao motivo ACCN₆GGT, uma sequência palindrômica denominada local de ligação de E2 (E2BS). Existem quatro E2BS presentes na LCR, e três destes encontram-se ao lado de sequências de E1 na origem de replicação (Antson *et al.*, 2000; Hegde, 2002; Cicero *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2006; You, 2010).

A interação da proteína E2 com o cromossomo mitótico é mediada pela proteína Brd4, um membro da família BET de proteínas que contêm um ou mais bromodomínios ligados às histonas acetiladas e, em certos membros da família, tais como Brd4, associados à cromatina durante a mitose. Cinco genes, denominados *brd1* a *brd5*, codificam os membros da família BET em células de mamíferos (Mcbride *et al.*, 2004). O gene *brd4* codifica uma fosfoproteína nuclear de 200-kDa, Brd4, que é expressa em muitos tecidos, cuja síntese é induzida em resposta à

estímulos para o crescimento. Brd4 regula o crescimento celular por múltiplos mecanismos, agindo em diferentes estágios do ciclo celular (Mcbride *et al.*, 2004).

Brd4 desempenha papel central tanto no controle da progressão do ciclo celular, quanto na regulação da proliferação celular. O domínio celular C-terminal de Brd4 interage com a proteína E2. Esta interação com Brd4 é crucial tanto para as atividades de transativação, quanto para a função repressora de E2. Esta proteína viral, associada ao domínio C-terminal da proteína celular, inibe a ligação de outros importantes fatores celulares, na mesma região, levando ao funcionamento anormal de Brd4. Assim E2, ao formar um complexo com Brd4, pode inibir a associação de importantes fatores, como P-TEFb, e proteínas celulares, como SPA-1, reduzindo suas funções intracelulares (Farina *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2010; You, 2010). Este complexo E2-Brd4 é fundamental para o desenvolvimento das duas mais importantes funções de E2: manter o genoma viral associado à cromatina e controlar a ativação e repressão dos genes das oncoproteínas E6 e E7 (Smith *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010; You, 2010).

2.3.4 – Proteínas virais E4, L1 e L2

A proteína E4 é expressa nas camadas diferenciadas do epitélio e tem sido co-localizada com a proteína L1. A proteína E4 se associa com ceratinas do citoesqueleto das células epiteliais e induz o colapso da rede de ceratinas. Isto sugere papel de E4 na facilitação da saída do vírus da célula. E4 também pode desempenhar papel na regulação da expressão gênica, porque interage com RNA helicase envolvida na processamento, transporte e início da tradução de mRNA (Florin *et al.*, 2002).

As proteínas estruturais do HPV são expressas nas camadas superiores do epitélio. L1 e L2 são semelhantes estruturalmente. L2 é a proteína menor do capsídeo produzida em células que expressam E4. L1 é a proteína principal do capsídeo, expressa nas células após L2 (Florin *et al.*, 2002).

O capsídeo viral contém 360 cópias de L1 e, provavelmente, 12 cópias de L2, organizadas em uma estrutura icosaédrica com 72 capsômeros (Florin *et al.*, 2002).

2.3.5 – Oncoproteínas virais E5, E7 e E6

As atividades oncogênicas das proteínas virais E5, E6 e E7 em cultura de tecido e em modelos animais têm sido documentadas extensivamente. A expressão dessas oncoproteínas em ceratinócitos humanos facilita sua imortalização e está relacionada à progressão da lesão cervical positiva para os HR-HPV.

A oncoproteína E5 do HPV é fortemente hidrofóbica e se associa às membranas do complexo de Golgi, retículo endoplasmático e carioteca nas células do hospedeiro. E5 é composta por três hélices e regiões do N e C terminais curtas que se estendem por entre a bicamada lipídica. O mRNA e a proteína E5 são abundantes no terço basal das lesões cervicais de baixo grau (Alonso e Reed, 2002; Tsai e Chen, 2003). Esta proteína está relacionada ao início da infecção, estimulando o crescimento celular através de interações feitas com os receptores do fator de crescimento epitelial (EGFR), do fator- β de crescimento derivado de plaqueta (PGDFR) e do fator estimulante de formação de colônia. Através da ligação a esses receptores, E5 pode ativar proteínas ativadas por mitógenos (MAP) quinases por duas vias diferentes: via proteína cinase C (PKC) dependente e via mediada por receptor tirosina cinase (PKC independente) (Crusius *et al.*, 2000; Genter *et al.*, 2003).

A oncoproteína E7 do HPV é encontrada, predominantemente, no núcleo celular e tem, aproximadamente, 100 aminoácidos. A ação central da E7 é sua habilidade de se ligar às proteínas da família da pRB no sítio de ligação de fatores de transcrição, como os membros da família E2F, permitindo que estes estimulem a proliferação celular, após formação do complexo E7-pRB. E7 também pode se associar com outras proteínas envolvidas na proliferação celular, incluindo histonas desacetilases, componentes do complexo de transcrição AP-1 e inibidores de Cdk p21 e p27 (Collins *et al.*, 2005; Gammoh *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Graham, 2010; Bodily e Laimins, 2011).

A oncoproteína E6 do HPV complementa o papel indutor de proliferação celular da oncoproteína E7, evitando a indução de apoptose em resposta a proliferação celular mediada por E7 (Chakrabarti e Krishna, 2003). E6 se associa à proteína p53, inativando suas funções de supressão do crescimento e indução da apoptose. E6 também se associa com outras proteínas pró-apoptóticas, incluindo

proteínas Bak e Bax (Mcmurray e Mccance, 2004; Nomine *et al.*, 2006; Graham, 2010; Bodily e Laimins, 2011).

A oncoproteína E6 também pode estimular a proliferação celular independentemente da oncoproteína E7, através de seu domínio ligante C-terminal PDZ (Lee e Laimins, 2004; Lee *et al.*, 2007).

Outra importante função da oncoproteína E6 dos HR-HPV na carcinogênese cervical é a indução da degradação da proteína 1 alvo de E6 (E6TP) via E6AP ubiquitina ligase. A E6TP1 apresenta um domínio catalítico de proteínas ativadoras da ligação do nucleotídeo guanina (GTPase) similar ao domínio catalítico da proteína RAP1GAP. A proteína E6 do HPV, promovendo a degradação do E6TP1, eleva os níveis de RAP1 GTP, indicando que a oncoproteína E6 do HPV ativa RAP1 durante a transformação celular (Chakrabarti e Krishna, 2003; Lee *et al.*, 2007).

2.4 – História natural da infecção genital pelo HPV e neoplasia cervical

2.4.1 – Anatomia funcional do colo uterino

O colo uterino ou cérvix é a porção inferior do útero, que conecta o útero à vagina através do canal endocervical (FIGURA 5A). A superfície mucosa externa do colo uterino, a partir do orifício externo e voltada para a vagina, é conhecida como ectocérvice (FIGURA 5B) e a superfície mucosa interna, relacionada ao canal endocervical, corresponde à endocérvice (Rosai, 2011).

A maior parte da ectocérvice é recoberta por epitélio escamoso não ceratinizado, que é composto por três camadas: células basais, estrato espinho e superficial. A parte mais inferior do estrato espinhoso, denominada suprabasal, e a camada basal abrigam as células tronco da mucosa escamosa cervical (Rosai, 2011).

A mucosa glandular da endocérvice é formada por camada de células colunares secretoras de muco. Abaixo destas células, há uma camada de células de reserva, contínua com a camada basal da ectocérvice (Rosai, 2011). O local de encontro entre os epitélios escamoso e colunar é denominado junção escamo-colunar (FIGURA 5C).

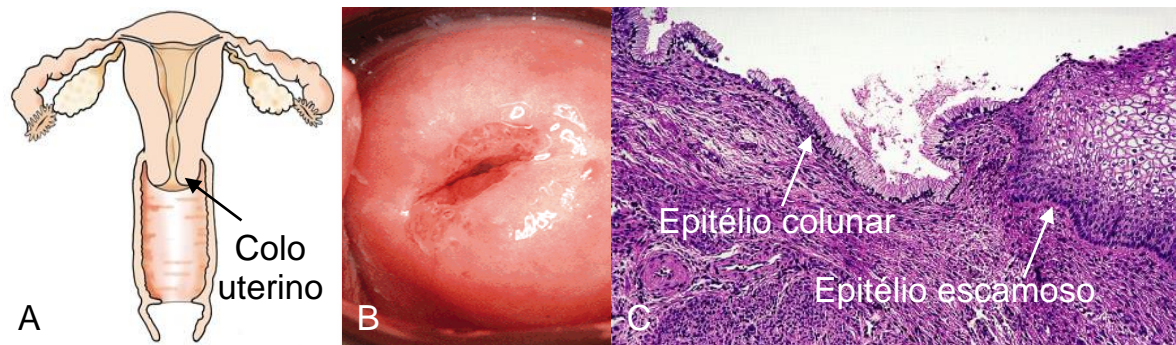


FIGURA 5 – Anatomia e histologia funcionais do útero A - Útero, vagina e anexos uterinos. A seta indica o colo uterino. B - Imagem de ectocérvice. Observam-se a zona de transformação periorifical e a eversão da endocérvice. C - Microfotografia da junção escamo-colunar. Observam-se os epitélios colunar e escamoso sem atipias morfológicas (HE, aumento 100X).

Fonte: Rosai, 2011. (Houve alteração na ilustração, para fins didáticos).

A localização da junção escamo-colunar do colo uterino é variável e sofre influência sobretudo da idade, fatores hormonais e período do ciclo menstrual. Em recém-nascidas, a junção está localizada no nível do orifício externo do canal endocervical. No período da menarca, a junção escamo-colunar move-se para fora do orifício externo do canal endocervical, constituindo o ectrópio. Nas áreas de epitélio evertido, surge a metaplasia escamosa, a substituição do epitélio colunar mucossecretor por epitélio escamoso estratificado (Rosai, 2011).

2.4.2 – Epidemiologia da infecção genital pelo HPV e neoplasia cervical

Infecção genital pelo HPV é a mais comum infecção sexualmente transmissível entre jovens nos países em desenvolvimento. Cerca de 30 milhões de novos casos de HPV genital são diagnosticados a cada ano, mundialmente (Scheurer *et al.*, 2005).

No Brasil, cerca de 50% da população em idade reprodutiva é infectada pelo HPV genital, e a maioria das mulheres sexualmente ativas serão infectadas ao longo da vida. Infecções com os tipos oncogênicos de HPV representam 50-75% de todas as infecções pelo HPV (Baseman e Koutsky, 2005; Carvalho *et al.*, 2005; Scheurer *et al.*, 2005; Burchell *et al.*, 2006; Trottier e Franco, 2006).

A prevalência do HPV em mulheres assintomáticas encontra-se entre 2-44%. Há um pico da prevalência de HPV entre mulheres jovens até 25 anos de idade, seguido de um declínio na prevalência entre 45-50 anos de idade e um segundo pico nos anos peri-menopausa. As razões associadas ao segundo pico de aumento da prevalência são explicadas por reativação de infecção latente, diminuição gradual da imunidade e aquisição de novas infecções (Cavalcanti *et al.*, 2000; Burchell *et al.*, 2006; Dunne e Markowitz, 2006).

Dados brasileiros do sistema de informação sobre rastreamento do câncer cervical (SISCOLO) demonstram diagnósticos citológicos de NIC 1 e NIC 2/3 de 2.262 e 383 casos por 100.000 testes de Papanicolaou, estimando a prevalência máxima de 3% e 2% para NIC 1 e NIC 2/3, respectivamente. Dados do SISCOLO sobre o diagnóstico citológico do câncer cervical revelam 54 casos por 100.000 testes de Papanicolaou realizados (D'ottaviano-Morelli *et al.*, 2004; Estimativa, 2010).

Dados de 2010 do Instituto Nacional do Câncer (INCA) confirmam a permanência do câncer cervical como a segunda neoplasia mais comum entre mulheres no Brasil, com 18.430 casos novos da doença invasiva, o que representa 18 casos por 100.000 mulheres. Destaque também para a existência de grandes variações regionais. Na Região Norte é o câncer mais frequente, representando 24,3% de todos os casos de câncer no sexo feminino. Na Região Sudeste continua o terceiro tumor mais frequente em mulheres, com 7,8% do total de casos novos. Nas capitais dos Estados da Região Norte a sua incidência estimada é de 39,6 casos por 100.000 mulheres, ou seja, maior que o dobro da média nacional (Estimativa, 2010).

2.4.3 – Transmissão e fatores de risco para a infecção genital pelo HPV

Estudos entre mulheres inicialmente virgens confirmaram a transmissão sexual da infecção por HPV pelo contato sexual com parceiro infectado, presumivelmente decorrente de lesões microscópicas presentes na mucosa ou pele dos seus parceiros (Schiffman e Kjaer, 2003; Burchell *et al.*, 2006; Stanley, 2010).

A idade e o número de parceiros sexuais têm sido consistentemente associados com infecção pelo HPV. As maiores médias de infecção genital pelo

HPV ocorrem entre os 15 e 25 anos e refletem a transmissão da infecção no início da atividade sexual. A prevalência de HPV aumenta com o número de parceiros sexuais ao longo da vida e com o número de parceiros sexuais recentes. Outros fatores independentes associados ao risco de infecção são o grupo étnico/raça, o uso de contraceptivos orais e características do comportamento sexual (Castellsague e Munoz, 2003; Castle e Giuliano, 2003; Scheurer *et al.*, 2005; Stanley, 2010).

2.4.4 – Resposta imune à infecção genital pelo HPV

A infecção pelo HPV e a multiplicação viral no epitélio escamoso são dependentes da diferenciação do ceratinócito. Durante a replicação natural, as proteínas antigênicas do capsídeo são expressas nas camadas mais superficiais do epitélio, onde a vigilância imune não pode reconhecê-las. Não existe citólise ou morte citopática como consequência da replicação, montagem ou liberação da partícula viral. Somam-se a estes, os mecanismos de evasão da resposta imune inata determinados pela atividade repressora das oncoproteínas E6 e E7, das sinalizações pelo interferon (IFN) e fator nuclear kB (NFkB), além da resistência das células infectadas pelo HPV às células *natural Killer* (NK). Desta forma, a infecção pelo HPV não é acompanhada por inflamação e não há sinais de alerta ao sistema imune da presença dele (Woodworth, 2002; Stanley, 2006; 2010).

A soroconversão com anticorpos contra tipos de HPV pode levar de 6 meses a 1 ano, desde o início da infecção. A soroconversão contra proteínas do capsídeo é lenta, mas os níveis de anticorpos se mantêm estáveis por 10-15 anos. A produção de anticorpos é importante porque evita a disseminação da infecção e reinfecção (Scheurer *et al.*, 2005).

Entretanto, as evidências atuais mostram que a regressão da infecção está associada a uma forte resposta imune celular do tipo 1. Esta resposta envolve a interação de células apresentadoras de antígeno (APC), linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ e citocinas co-estimuladoras. Exame histológico de lesões em regressão mostram grande infiltrado de linfócitos T CD4+ e CD8+ expressando marcadores de ativação celular e moléculas de adesão requeridas para o tráfego de linfócitos no endotélio (Stanley, 2001; Stanley, 2006; 2010).

O HPV tem mecanismos eficientes que evitam uma apresentação efetiva de antígenos pelas APC aos linfócitos através de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). As proteínas E5 e E7 reprimem a atividade da cadeia pesada das moléculas da classe I do MHC e suprimem a apresentação de antígeno pelas moléculas da classe II do MHC. As oncoproteínas do HPV podem evitar a atividade dos IFN- α e IFN- β e de citocinas, como a interleucina-18, necessários para a resposta imune celular (Tindle, 2002; Stanley, 2006; 2010).

2.4.5 – Persistência da infecção versus *clearence* viral

A maioria das infecções por papilomavírus são transitórias e resolvem-se espontaneamente. A maioria das infecções cervicais por HPV, incluindo os tipos de alto risco, torna-se indetectável entre um a dois anos. Presumivelmente, elas são controladas completamente pelo sistema imune mediado por células ou estão em um estado de latência, caracterizado por uma expressão restrita das proteínas precoces virais E1 e E2. Se há falha imunológica no controle do vírus, uma infecção persistente, com altos níveis de replicação de HPV, é estabelecida (Ferenczy e Franco, 2002; Schiffman e Kjaer, 2003; Bodily e Laimins, 2011)

A persistência da infecção pelo HPV, caracterizada por uma infecção detectável de longa duração, é incomum quando comparada ao *clearence* viral. De um ponto de vista prático, a persistência pode ser definida como a detecção do mesmo tipo de HPV duas ou mais vezes por um período de tempo. Não existe consenso deste tempo de detecção, e sim uma tendência de se considerar 18 meses, de acordo com o curso natural da infecção genital por HR-HPV. O HPV é altamente infeccioso, com período de incubação de 3 semanas a 8 meses após a infecção. O vírus estabelece infecção produtiva e NIC 1. A eliminação do vírus é associada com resposta imune, tanto celular, quanto humoral. Cerca de 80% a 90% das infecções têm remissão clínica. Entretanto, infecção subclínica pode persistir por tempo indeterminado. Essas infecções persistentes podem progredir para NIC 2, NIC 3 e, posteriormente, câncer cervical invasor, em cerca de 10% a 20% dos casos. (FIGURA 6) (Tindle, 2002; Schiffman e Kjaer, 2003; Stanley, 2006; 2010).

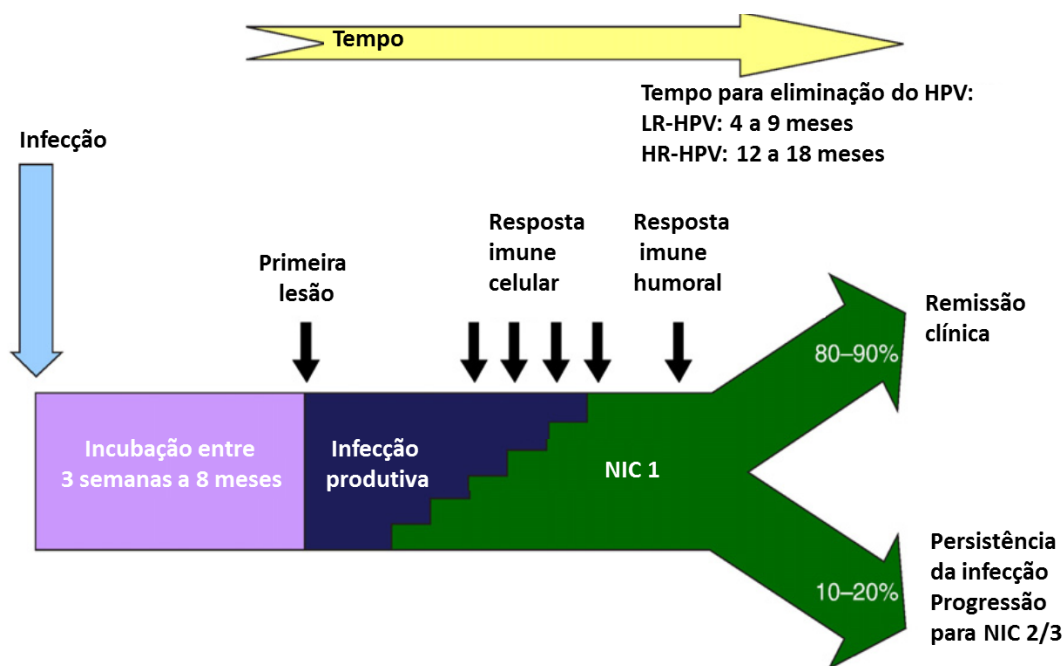


FIGURA 6 - História natural da infecção genital por HPV. HPV é altamente infeccioso, com período de incubação de 3 semanas a 8 meses após a infecção. Então, o vírus estabelece infecção produtiva e NIC 1. A eliminação do vírus é associada com resposta imune celular. Entretanto, infecção subclínica pode persistir por tempo indeterminado. Infecções persistentes podem progredir para NIC 2, NIC 3 e, posteriormente, câncer cervical invasor.

Fonte: Stanley, 2010. (Houve alteração na ilustração, para fins didáticos).

2.4.6 – Progressão da infecção para neoplasia intraepitelial cervical

Na ausência de regressão, as lesões intraepiteliais podem persistir e podem, em alguns casos, progredir para câncer cervical invasor. A persistência do HPV na mucosa cervical é crucial para o desenvolvimento da neoplasia intraepitelial cervical e do câncer cervical invasor (Schiffman e Kjaer, 2003; Doorbar, 2005; Moscicki *et al.*, 2006). As lesões cervicais de baixo grau (NIC 1) lembram infecções produtivas causadas por HPV, enquanto as lesões de alto grau (NIC 2 e NIC 3) têm uma fase proliferativa com ruptura do gene da proteína E2 e integração do DNA do vírus no genoma celular (Middleton *et al.*, 2003; Thomison *et al.*, 2008). A integração neste ponto preserva as regiões dos genes das oncoproteínas E6 e E7 e elimina a modulação negativa da proteína E2. Assim, os eventos mais importantes na progressão da lesão produtiva para uma neoplasia de alto grau podem ser resultado de uma desregulação na expressão das proteínas transformantes E6 e E7, que leva ao aumento da proliferação celular nas camadas inferiores do epitélio e de uma incapacidade para reparar corretamente o DNA celular (Von Knebel Doeberitz, 2002).

A progressão de NIC 3 para câncer cervical invasor usualmente ocorre nas lesões que contêm cópias múltiplas do genoma viral integrado ao genoma celular, com conseqüente expressão elevada de E7, e instabilidade genômica celular (Zur Hausen, 2002; Doorbar, 2005).

A determinação de fatores virais que desempenham papel na patogênese da neoplasia cervical é importante para distinguir mulheres com alto risco de persistência da infecção pelo HPV e de progressão para carcinoma invasor. Dentre os fatores virais, os mais importantes são o tipo de HPV, a quantificação da carga viral por ferramentas da biologia molecular e a determinação da integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira (Zur Hausen, 2002; Wang e Hildesheim, 2003; Scheurer *et al.*, 2005; Brummer *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006).

2.5 – Neoplasia intraepitelial cervical

O conceito de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) foi empregado, em 1973, para se referir a um espectro de alterações citológicas e arquiteturais intraepiteliais que se iniciariam com a displasia leve e culminariam com o carcinoma invasor (Crum, 2003). Essa classificação tem grande importância histórica e prática, porque representa o principal modelo teórico de identificação morfológica de lesões precursoras de câncer cervical (Mount *et al.*, 2003). Esta divisão determina a existência de três graus de lesões precursoras: NIC 1, equivalente à displasia leve e com distúrbios celulares comprometendo o terço inferior do epitélio; NIC 2, equivalente à displasia moderada e com distúrbios celulares comprometendo os dois terços inferiores do epitélio; NIC 3, correspondendo a displasia acentuada, severa ou carcinoma *in situ* e com distúrbios celulares comprometendo toda a espessura do epitélio (Mount *et al.*, 2003).

No final de 1980, para aproximar a classificação morfológica com a própria história natural destas lesões intraepiteliais cervicais associadas à infecção por HPV, o sistema Bethesda de classificação das lesões cervicais pré-invasivas foi introduzido, dividindo as lesões cervicais em dois grupos funcionais. A classificação Bethesda utiliza o termo genérico lesão intraepitelial escamosa (LIE) de baixo (NIC 1) ou de alto grau (NIC 2/3). (Crum, 2003; Mount *et al.*, 2003; Schneider, 2003; Crothers, 2005). As lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau correspondem à

NIC 1 e as lesões intraepiteliais escamosas de alto grau às NIC 2 e NIC 3. Desta forma, a interpretação das lesões epiteliais precursoras do câncer cervical permite a correlação com a sua patogênese, ou seja, a observação das características morfológicas observadas no epitélio, tanto na camada basal, pela proliferação das células basais, quanto nos estratos superficiais, pela coilocitose, indicam uma infecção produtiva por HPV na NIC 1 (FIGURA 7).

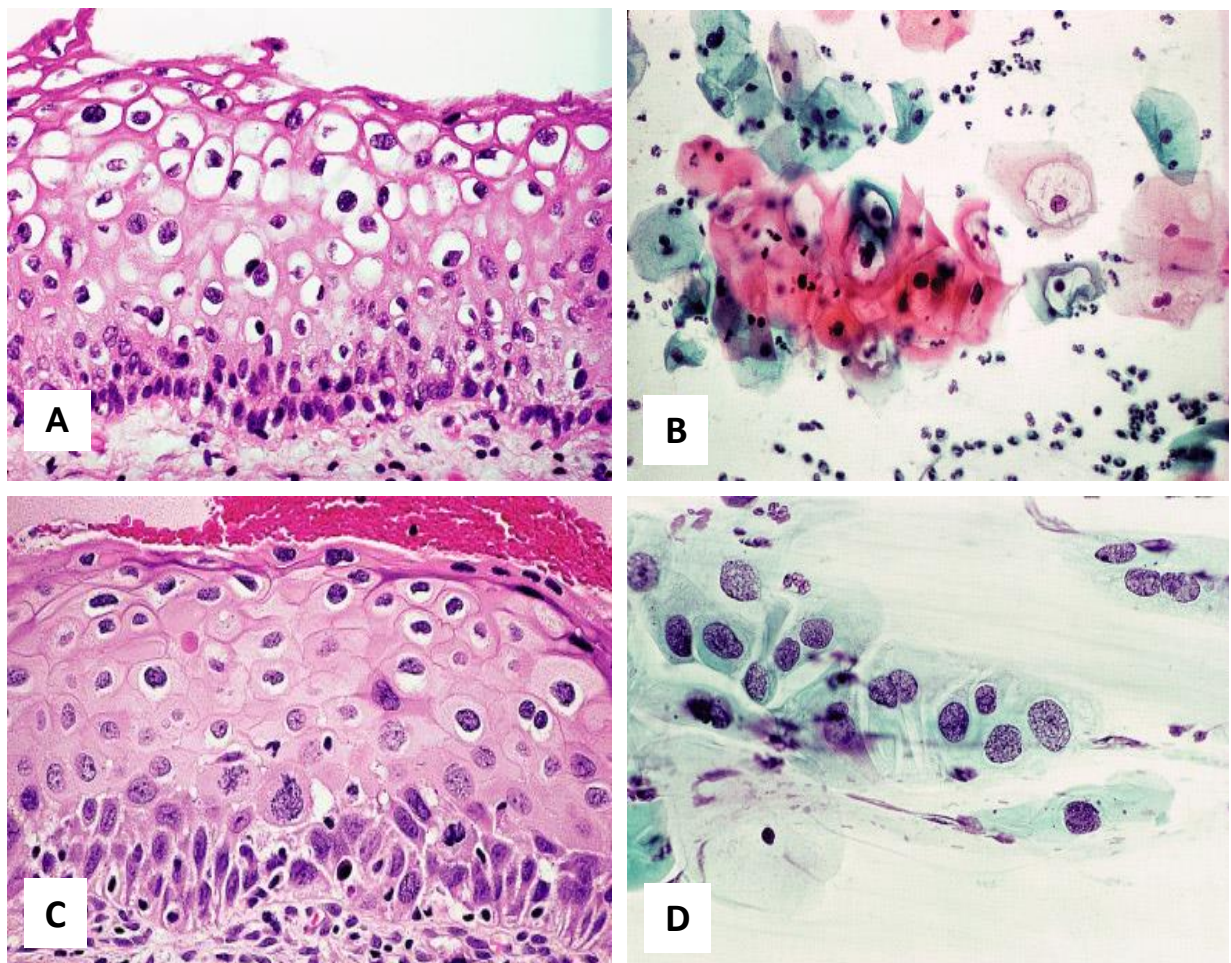


FIGURA 7 - Mucosa ectocervical com NIC 1. A e B – características histopatológica e citopatológica da infecção produtiva por HPV, representadas por coilocitos nas camadas superficiais do epitélio e nas células superficiais e intermediárias esfoliadas. Os coilocitos apresentam cariomegalia, hiper cromasia nuclear, irregularidade do contorno da carioteca e halo claro citoplasmático perinuclear com reforço periférico. Presença também de células inflamatórias. C - atipias das células basais epiteliais restritas ao terço inferior epitelial e representadas por cariomegalia, cromatina heterogênea e FIGURA atípica de mitose. Observam-se linfócitos intraepiteliais. D - agrupamento de células intermediárias com cariomegalia, cromatina heterogênea, nucléolos inconspícuos e aumento da relação núcleo/citoplasma (A e C: HE aumento 400X; B e D: Papanicolaou aumento 400X)

Fonte: Rosai, 2011.

Da mesma forma, as características marcantes da displasia, especialmente as atipias celulares e a desorganização arquitetural do epitélio, são observadas na NIC 2/3. A interpretação dessas lesões epiteliais precursoras de alto grau também permitem o estabelecimento de correlação das características morfológicas observadas no epitélio, marcadas pela perda da polaridade e da maturação celulares, à ausência de infecção produtiva por HPV na NIC 2/3 (FIGURA 8).

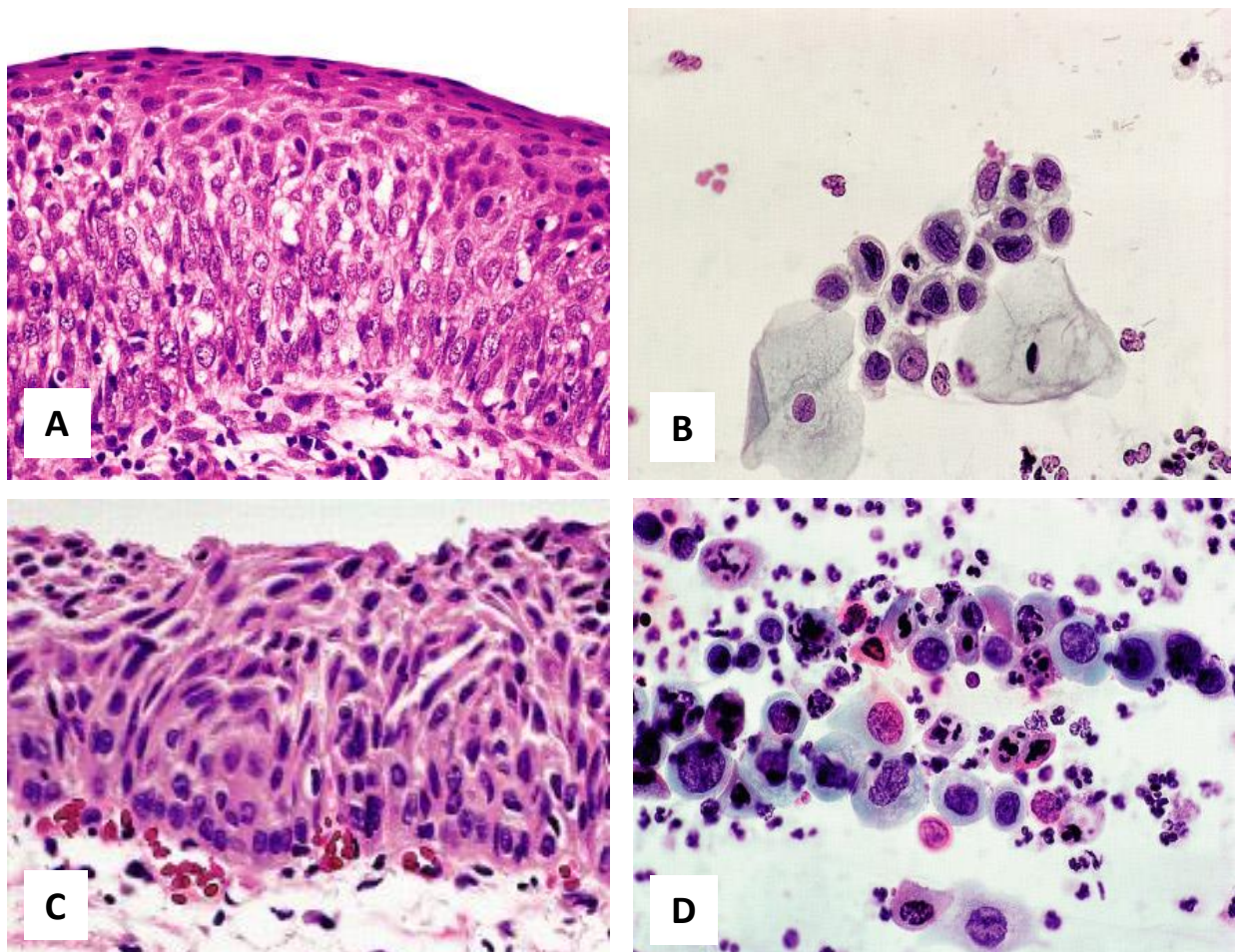


FIGURA 8 - Mucosa ectocervical com NIC 2/3. A - epitélio escamoso com atipias das células basais comprometendo dois terços da espessura total e diferenciação escamosa restrita ao terço superficial do epitélio. As células basais atípicas caracterizam-se por cariomegalia, hipercromasia nuclear, cromatina heterogênea. B - grupamento de células basais atípicas com grande aumento da relação núcleo/citoplasma, hipercromasia nuclear e contornos irregulares da carioteca. C - proliferação de células atípicas comprometendo toda a espessura do epitélio, sem evidência de diferenciação e maturação escamosa. D - predomínio de células com maturação anormal, disceratóticas, com hipercromasia nuclear e cromatina grosseira, em meio a exsudato inflamatório neutrofílico (A e C: HE aumento 400X; B e D: Papanicolaou aumento 400X).

Fonte: Rosai, 2011.

2.5.1 – Diagnóstico da neoplasia intraepitelial cervical

O diagnóstico da neoplasia intraepitelial cervical é realizado através do emprego integrado e coordenado dos métodos de citologia cervical, colposcopia, histopatologia e, mais recentemente, de técnicas de moleculares.

Desde sua descrição por George Papanicolaou, em 1940, o método permanece essencialmente o mesmo, baseando-se na interpretação morfológica de esfregaços de células epiteliais da superfície do colo uterino. Dentre os critérios citológicos selecionados para análise, incluem-se tamanho nuclear/tamanho celular, forma do núcleo, intensidade de coloração do núcleo, forma da membrana nuclear, dentre outros (Von Knebel Doeberitz, 2002; Gravitt e Jamshidi, 2005).

O sucesso do teste de Papanicolaou é dependente de vários fatores pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos, como experiência do ginecologista, coleta adequada das amostras, fixação imediata dos esfregaços em álcool, interpretação padronizada dos achados citopatológicos, seguimento clínico do teste anormal, tratamento da lesão precursora confirmada e, fundamentalmente, a frequência de repetição do teste (Gravitt e Jamshidi, 2005).

Diante de um teste de Papanicolaou anormal, apresentando como resultado células atípicas de significado indeterminado (ASCUS) ou lesão intraepitelial escamosa de baixo ou de alto grau, é indicada uma colposcopia. O exame colposcópico envolve uma visualização mais rigorosa e magnificada do colo uterino, associada à aplicação de solução de ácido acético 3% a 5%. A observação de áreas suspeitas ou irregulares na superfície cervical indica uma biópsia (FIGURA 9) (Gravitt e Jamshidi, 2005).

O exame histopatológico da biópsia de uma área suspeita à colposcopia é considerado padrão ouro para o diagnóstico da neoplasia cervical. A graduação histopatológica da biópsia cervical usa a terminologia NIC. A classificação pelo sistema NIC equivale à categorização das lesões intraepiteliais escamosas pelo sistema Bethesda, onde lesão intraepitelial escamosa de baixo grau inclui NIC 1 e lesão intraepitelial escamosa de alto grau inclui NIC 2 e NIC 3 (Gravitt e Jamshidi, 2005).

Correntes algoritmos para o diagnóstico da neoplasia cervical recomendam o uso de testes diagnósticos para a detecção do DNA do HPV em caso de citologia alterada. Estes testes para verificação do DNA do HPV utilizam as metodologias da

captura híbrida e da reação em cadeia da polimerase (PCR). A captura híbrida (Digene Diagnostics, Maryland) é um teste de hibridização molecular com detecção dos híbridos DNA/RNA por reação enzima-substrato e leitura por quimioluminescência. A captura híbrida é desenhada para detectar um ou mais dos treze tipos de HPV mais associados com a neoplasia cervical (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68). Testes para verificação do DNA do HPV são usados para melhor interpretar resultados equivocados no rastreamento, por exemplo, ASCUS, ou em combinação com a colpocitologia como um método mais sensível. Os resultados positivos para HPV no teste de DNA também indicam o exame colposcópico. Durante a colposcopia, as áreas do colo uterino suspeitas de lesão são biopsiadas para exame histopatológico e diagnóstico final (Gravitt e Jamshidi, 2005).

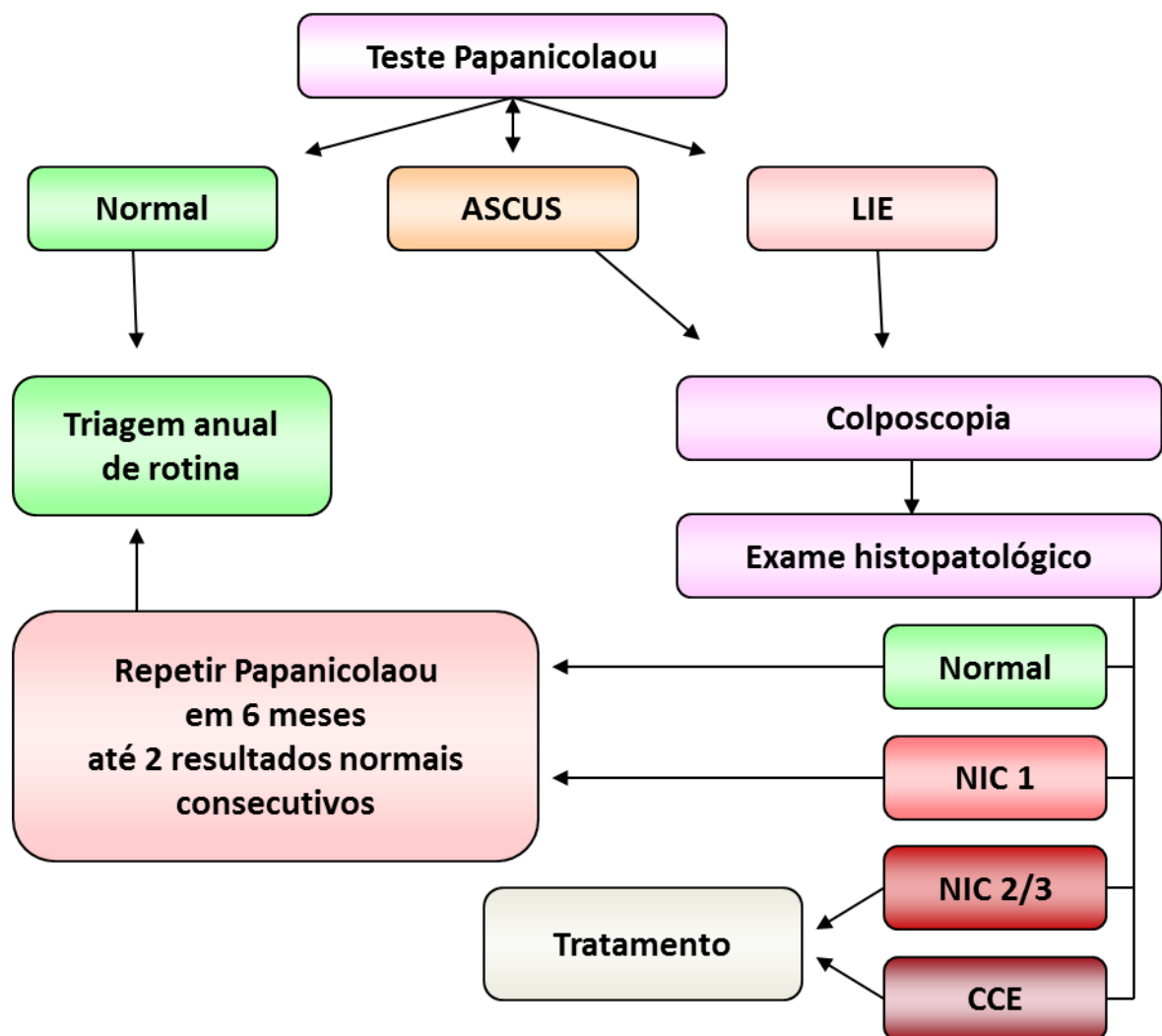


FIGURA 9 - Algoritmo para diagnóstico da neoplasia cervical

Fonte: Gravitt e Jamshidi, 2005. (Houve alteração na ilustração, para fins didáticos).

2.5.2 – Prevenção da neoplasia intraepitelial cervical

2.5.2.1 – Prevenção primária da infecção pelo HPV

O desenvolvimento de vacinas com partículas semelhantes ao vírus (VLP) utilizando a proteína L1 do HPV é o maior avanço potencial na prevenção do câncer cervical. A tecnologia da recombinação genética ou DNA recombinante permitiu o desenvolvimento de vacinas profiláticas para o HPV altamente imunogênicas. Diversos estudos de fase 1, 2 e 3 revelaram que a injeção intramuscular das VLP dos HPV 6, 11, 16 e 18 são capazes de estimular resposta humoral muitas vezes superior à encontrada após a infecção natural, e que a proteção é mediada por anticorpos presentes nas secreções cervicais ou no soro exsudado por traumas cervicais microscópicos (Schiffman *et al.*, 2007; Schiffman *et al.*, 2011).

No Brasil, duas vacinas estão disponíveis e aprovadas pela Agência Nacional de Controle de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso no Brasil, sendo uma quadrivalente (Gardasil, Merck®) e outra bivalente (Cervarix, Glaxo-Smith-Kline®) (Linhares e Villa, 2006). Desde Março de 2014, as vacinas contra o HPV fazem parte do calendário de vacinação, sendo gratuita no SUS para meninas entre 9 e 13 anos de idade. As meninas nesta faixa etária devem receber duas doses da vacina. A segunda dose deve ser oferecida 6 meses após a primeira. Os preços das vacinas bivalente e tetravalente são, em média, de R\$ 200,00 e R\$ 350,00, respectivamente, em clínicas particulares.

Importantes limitações e questões permanecem sobre o uso das vacinas VLP, como cobertura para a grande variedade viral, duração da proteção, eficácia, idade da indicação e uso em homens. As respostas para estas questões necessitam de mais estudos populacionais (Schiffman *et al.*, 2007; Schiffman *et al.*, 2011).

Embora o desenvolvimento e o uso de vacinas VLP anti-HPV demonstrem tendências na redução da infecção e conseqüentemente da neoplasia cervical associada ao HPV, é fundamental também salientar a necessidade simultânea do desenvolvimento de testes para o diagnóstico precoce da infecção persistente por HPV e para predição da evolução destas infecções para neoplasia cervical.

2.5.2.2 – Rastreamento

As estratégias de prevenção secundária da neoplasia cervical consistem no diagnóstico precoce das lesões assintomáticas do colo uterino. As principais metodologias para o rastreamento compreendem a colpocitologia oncológica ou teste de Papanicolaou, colposcopia, citologia em meio líquido, exame histopatológico e, mais recentemente, os testes de detecção do DNA do HPV em esfregaços citológicos ou amostras histopatológicas (Pinho *et al.*, 2003; Schiffman *et al.*, 2007; Thomison *et al.*, 2008; Tsoumpou *et al.*, 2009; Stanley, 2010; Schiffman *et al.*, 2011).

Os diagnósticos citopatológico e anatomopatológico precisos das lesões mediadas por HPV têm importantes implicações para orientar o tratamento, seja indicar tratamento cirúrgico ou observar a evolução das lesões. Entretanto, a elevada variabilidade intra e interobservador nas interpretações e classificações cito e histopatológica limitam o tratamento preciso porque tanto o exame citológico do esfregaço cervical, o teste de Papanicolaou, quanto o exame histopatológico da biópsia do colo uterino, baseiam-se na interpretação subjetiva de critérios morfológicos. Embora o exame histopatológico da biópsia continue o padrão ouro para o diagnóstico da NIC, erros no diagnóstico do grau da lesão ocorrem em cerca de 33% a 50% dos casos (Stanley, 2010; Schiffman *et al.*, 2011).

No Brasil, o rastreamento populacional é recomendado prioritariamente para mulheres entre 25 e 60 anos, com periodicidade de um ou três anos, após um resultado anormal ou dois exames consecutivos normais, respectivamente. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), para se obter um impacto significativo na mortalidade por câncer cervical, a cobertura de rastreamento deve atingir 80% ou mais da população-alvo (Estimativa, 2010).

Registrou-se no Sistema de Informação Ambulatorial (SIA), no ano de 2008, a realização de 11,8 milhões de exames citopatológicos do colo uterino, dos quais mais de 70% foram realizado na população-alvo, representando um aumento de 46% na oferta em relação a 1998, ano da primeira campanha do Programa Viva Mulher. Entretanto, essas estimativas considerou apenas o envio dos dados primários até o ano de 2008, desconsiderando-se dados do período que foram recebidos posteriormente (Estimativa, 2010).

O importante estudo americano ALTS (ASCUS / LSIL Triage Study) avaliou três algoritmos diferentes para conduta em pacientes com anormalidades citopatológicas de baixo grau. Eles incluíam colposcopia com biópsia imediata, citologia de repetição e teste para detecção do DNA de HPV, para verificar, principalmente, a eficácia da citologia de repetição versus testes de DNA do HPV. Todas as pacientes foram submetidas a colposcopia para biópsia e diagnóstico histopatológico definitivo. Como resultados mais expressivos, os testes do DNA do HPV foram positivos em mais de 86% dos casos de NIC 1 e 95% de NIC 2/3, com valores preditivos positivo e negativo de 20% e 99%, respectivamente, neste último grupo. A citologia de repetição apresentou sensibilidade de 85% e valores preditivos positivo de 17% e negativo de 96%, permitindo a conclusão de equivalência entre os dois grupos (Schiffman e Kjaer, 2003; Stoler, 2003; Thomison *et al.*, 2008).

O estudo ALTS também avaliou a reprodutibilidade interobservador de diagnósticos em esfregaços citológicos e nas biópsias colposcópicas. Os dados do ALTS confirmaram que a variabilidade do diagnóstico histológico, padrão ouro para definição da NIC, foi tão elevada quanto a variabilidade do diagnóstico citológico. Apenas 43% dos esfregaços com diagnóstico prévio de ASCUS foram confirmados pelo grupo revisor. Com relação ao exame histopatológico, a maioria das divergências ocorreram no diagnóstico de NIC 1, com apenas 42% de concordância (Thomison *et al.*, 2008; Schiffman *et al.*, 2011).

A análise dos dados da literatura, incluindo estudos brasileiros, deixa evidente a enorme variedade nas medidas de acurácia entre os diversos estudos, ampliando o significado dos resultados incorretos decorrentes da infecção por HPV, sem necessariamente caracterizarem desregulação celular do epitélio infectado. Desta forma, os principais métodos atualmente disponíveis para o rastreamento do câncer cervical têm importantes limitações para indicar, com precisão, o significado das alterações decorrentes da progressão da NIC (FIGURA 10), bem como distinguir a infecção viral produtiva, predominante na lesão intraepitelial de baixo grau (NIC 1) e não associada diretamente à transformação neoplásica, da infecção não produtiva, predominante na lesão intraepitelial de alto grau (NIC 2/3), com integração viral no genoma celular e diretamente associada à transformação neoplásica (Von Knebel Doeberitz, 2002; Thomison *et al.*, 2008; Schiffman *et al.*, 2011).

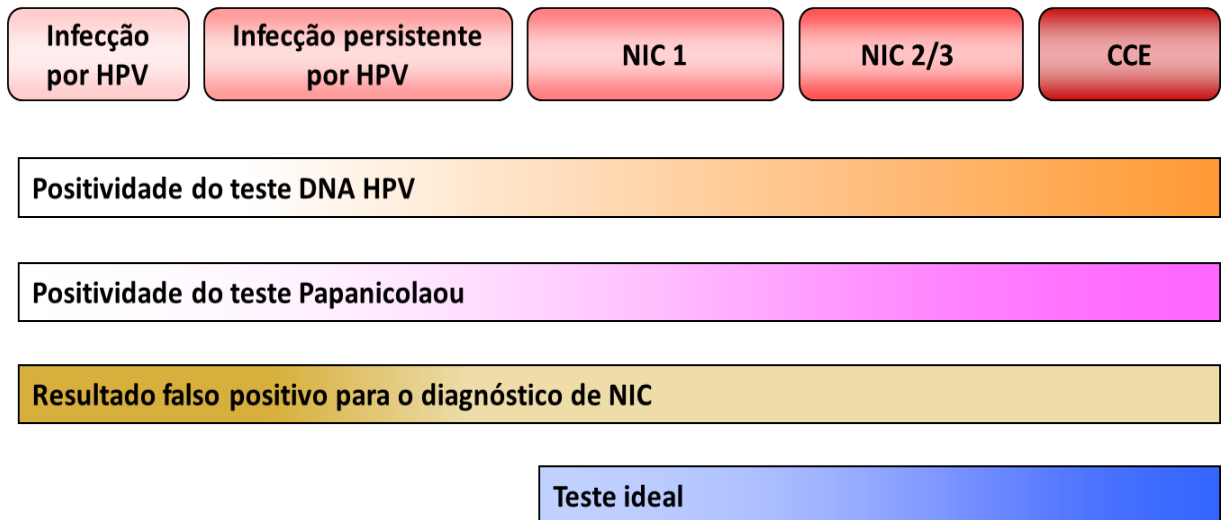


FIGURA 10 - Acurácia dos testes DNA-HPV e Papanicolaou para o diagnóstico da neoplasia cervical. Etapas da história natural da infecção por HPV e neoplasia cervical, representadas por caixas vermelhas, e resultados dos testes de rastreamento DNA HPV e Papanicolaou, representados por barras laranja e rosa, respectivamente. Os resultados falso positivo dos testes DNA HPV e Papanicolaou são representados por barra marrom. A intensidade da cor representa a quantidade de resultados positivos. Elevados valores de resultados falso positivo para neoplasia intraepitelial cervical são observados tanto para o teste Papanicolaou quanto para o teste DNA HPV. O teste ideal apresentaria elevada acurácia para o diagnóstico da neoplasia no curso da infecção por HPV.

Fonte: Von Knebel Doeberitz, 2002. (Houve alteração na ilustração, para fins didáticos).

2.5.3 – Aplicação clínica de biomarcadores na neoplasia intraepitelial cervical

No que se refere à aplicação clínica de biomarcadores, existem vários estudos e pesquisas tentando identificar moléculas reguladoras do ciclo e da proliferação celulares úteis na determinação da progressão da neoplasia intraepitelial cervical. Como exemplo, as proteínas p16, p14, Ki67, ProEx C, MCM5, p105, p107, RB2/p130, E2F4, p21 e Ciclina A, representam as moléculas mais estudadas (Santopietro *et al.*, 2006).

A infecção persistente por HPV é significativamente associada com a progressão da lesão intraepitelial de baixo grau para alto grau e carcinoma invasor, por meio da ação de suas oncoproteínas E5, E6 e E7, que promovem desregulação do ciclo celular e proliferação celular anormal (Von Knebel Doeberitz, 2002; Thomison *et al.*, 2008; Bodily e Laimins, 2011; Schiffman *et al.*, 2011).

O ciclo celular é controlado por uma família de proteínas cinases, denominadas cinases dependentes de ciclina (Cdk), que tem como atividade básica

a fosforilação de outras proteínas substrato. As Cdk desempenham sua função cinase apenas quando associadas às ciclinas, constituindo os complexos ciclina-Cdk, cuja atividade é dependente do padrão cíclico de acúmulo e degradação da ciclina (Jordão e Andrade, 2000; Brenna e Syrjänen, 2003).

Durante a fase G1 do ciclo celular, a ciclina D se liga e ativa a Cdk4, formando o complexo ciclina D-Cdk4 que fosforila proteína pRB e libera o fator E2F, essencial para a progressão do ciclo através da fase G1. A atividade dos complexos ciclina-Cdk é regulada por proteínas inibidoras e ativadoras. A p16 compete com a ciclina D e inibe a capacidade do complexo D-Cdk4 de fosforilar a pRB (Abbas *et al.*, 2005).

Superexpressão de p16 ocorre na neoplasia cervical como resultado da inativação de pRB pela oncoproteína viral E7. O padrão de expressão de p16 tem sido extensivamente investigado e demonstra forte associação com displasia cervical (Hu *et al.*, 2005; Kalof *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2005; Kalof e Cooper, 2006; Cuschieri e Wentzensen, 2008; Tsoumpou *et al.*, 2009; Walts e Bose, 2009; Romagosa *et al.*, 2011).

O valor da proteína p16INK4A como biomarcador da infecção por HPV e neoplasia intraepitelial é objeto de estudos que procuram relacionar a expressão de p16 em células epiteliais cervicais neoplásicas com infecção por HPV e grau da neoplasia (Kalof e Cooper, 2006).

A integração do DNA do HPV no genoma humano resulta em superexpressão das oncoproteínas E6 e E7. Assim a integração do DNA do HPV se correlaciona fortemente com o nível de p16 na célula do hospedeiro infectada (Peitsaro *et al.*, 2002; Cuschieri e Wentzensen, 2008; Tsoumpou *et al.*, 2009; Walts e Bose, 2009; Romagosa *et al.*, 2011).

Considerando a alta concordância entre a expressão de p16 e a progressão das lesões intraepiteliais de baixo para alto grau, postula-se que p16 pode contribuir para distinguir as lesões de baixo grau com risco aumentado de progressão para lesão de alto grau e câncer invasor (Kalof e Cooper, 2006).

Na avaliação imuno-histoquímica de amostras de colo uterino utilizando p16, há diminuição da variabilidade intraobservador no diagnóstico das lesões intraepiteliais cervicais, principalmente no diagnóstico das lesões intraepiteliais de alto grau, caracterizando a imuno-histoquímica para p16 como acurada no diagnóstico de NIC 2 e NIC 3 (Thomison *et al.*, 2008). Entretanto, questões

fundamentais para a avaliação clínica de p16, como falta de padronização na preparação das amostras para imuno-histoquímica e nos critérios para interpretação dos cortes histopatológicos, têm reduzido a reprodutibilidade do método e dificultado a interpretação dos dados de diferentes estudos sobre p16. Por conseguinte, as evidências disponíveis não permitem a formulação de recomendações definitivas sobre as aplicações da p16 na prática clínica (Tsoumpou *et al.*, 2009).

Neste cenário de limitações da aplicação dos primeiros biomarcadores descritos na prática clínica, a proteína RAP1, uma pequena GTPase da superfamília RAS, desponta como candidata a biomarcador da NIC e alvo antitumoral no câncer cervical.

2.6 – Proteína RAP1

Existem evidências cumulativas indicando o potencial envolvimento da proteína RAP1 e de suas proteínas regulatórias GEF e GAP nos distúrbios de proliferação e diferenciação epiteliais e hematopoiéticos. Tem sido demonstrado que a ativação constitutiva de RAP1 e sua localização subcelular, em consequência da degradação de proteínas reguladoras da família SPA-1, transformam *in vitro* células epiteliais infectadas pelo HPV. Camundongos deficientes da proteína SPA-1 desenvolvem neoplasias hematológicas. Estas evidências demonstram que a regulação aberrante de RAP1 pode induzir transformação maligna de células epiteliais (Hattori e Minato, 2003; Mitra *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2003; Kometani *et al.*, 2004; Lafuente *et al.*, 2007; Frische e Zwartkruis, 2010).

2.6.1 – Regulação da sinalização RAP1

RAP1, membro das pequenas GTPases da superfamília RAS, foi descoberta como um produto do gene K-ver que revertia a transformação induzida por RAS em fibroblastos. RAP1 tem duas isoformas, RAP1A e RAP1B, com homologia de 95%, que são produtos de dois genes localizados nos cromossomos 1 e 12, respectivamente (Mitra *et al.*, 2003; Lafuente *et al.*, 2007).

Dentre as GTPase monoméricas estruturalmente similares à RAS, a proteína RAP1 funciona como transdutor bioquímico que regula o crescimento, diferenciação, sobrevivência e adesão das células eucariotas, alternando sua conformação entre uma forma inativa ligada ao GDP, RAP1-GDP, e uma forma ativa ligada ao GTP, RAP1-GTP. Esta alternância cíclica é mediada por fatores permutadores do nucleotídeo guanina (GEF), os ativadores, e por proteínas ativadoras de GTPase (GAP), as inativadoras. GEF facilita a liberação de nucleotídeos ligados a RAP1, enquanto GAP ampliam a atividade intrínseca GTPase de RAP1 de hidrolisar GTP a GDP (Bos *et al.*, 2001; Farina *et al.*, 2004; Lafuente *et al.*, 2007; Frische e Zwartkruis, 2010).

Em contraste à diversidade molecular de GEF, somente duas famílias de GAP específicas para RAP1 compartilham um domínio catalítico relacionado à GAP (GRD). Elas são as proteínas RAP GAP e as proteínas da família SPA-1. A família SPA-1 consiste de proteínas relacionadas estruturalmente, incluindo SPA-1, E6TP1 e isoformas semelhantes à SPA-1 (SPA-Ls). A proteína protótipo da família, SPA-1, foi isolada como uma proteína induzida por estímulos mitogênicos em células linfomatógenas (Hattori e Minato, 2003). SPA-1 está altamente expressa em células linfóides e sua deficiência está ligada ao desenvolvimento de desordens mieloproliferativas, associadas ao acúmulo anormal de RAP GTP (Kometani *et al.*, 2004).

2.6.2 – Funções biológicas de RAP1

Atualmente, a maioria dos estudos esclarece que RAP1 GTPase funciona independentemente de RAS e inicia eventos de sinalização celular em plaquetas e neutrófilos. RAP1 é ativada em linfócitos pelo TCR e CD28, em linfócitos B por ligação ao receptor das células B e em fibroblastos pela ligação ao EGF e PGDF (Lafuente *et al.*, 2007; Frische e Zwartkruis, 2010).

Embora as vias bioquímicas que são reguladas por RAP1 GTPase permaneçam indeterminadas, recentes estudos também têm elucidado o papel funcional de RAP1 na fisiologia celular. Em células epiteliais, RAP1 regula a formação do contato célula-célula através da E-caderina. Nas células HEK293, fator de crescimento dos hepatócitos (HGF) ativa RAP1 via cascata de eventos que envolve o receptor HGF (Lafuente *et al.*, 2007; Frische e Zwartkruis, 2010).

RAP1 está envolvida na adesão celular mediada por integrina de células hematopoéticas e migração transendotelial de linfócitos T. RAP1 também está envolvida na adesão de células hematopoéticas induzida por citocinas mediada pela $\beta 1$ integrina (FIGURA 11) (Hattori e Minato, 2003; Mitra *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2003; Kometani *et al.*, 2004; Lafuente *et al.*, 2007; Frische e Zwartkruis, 2010).

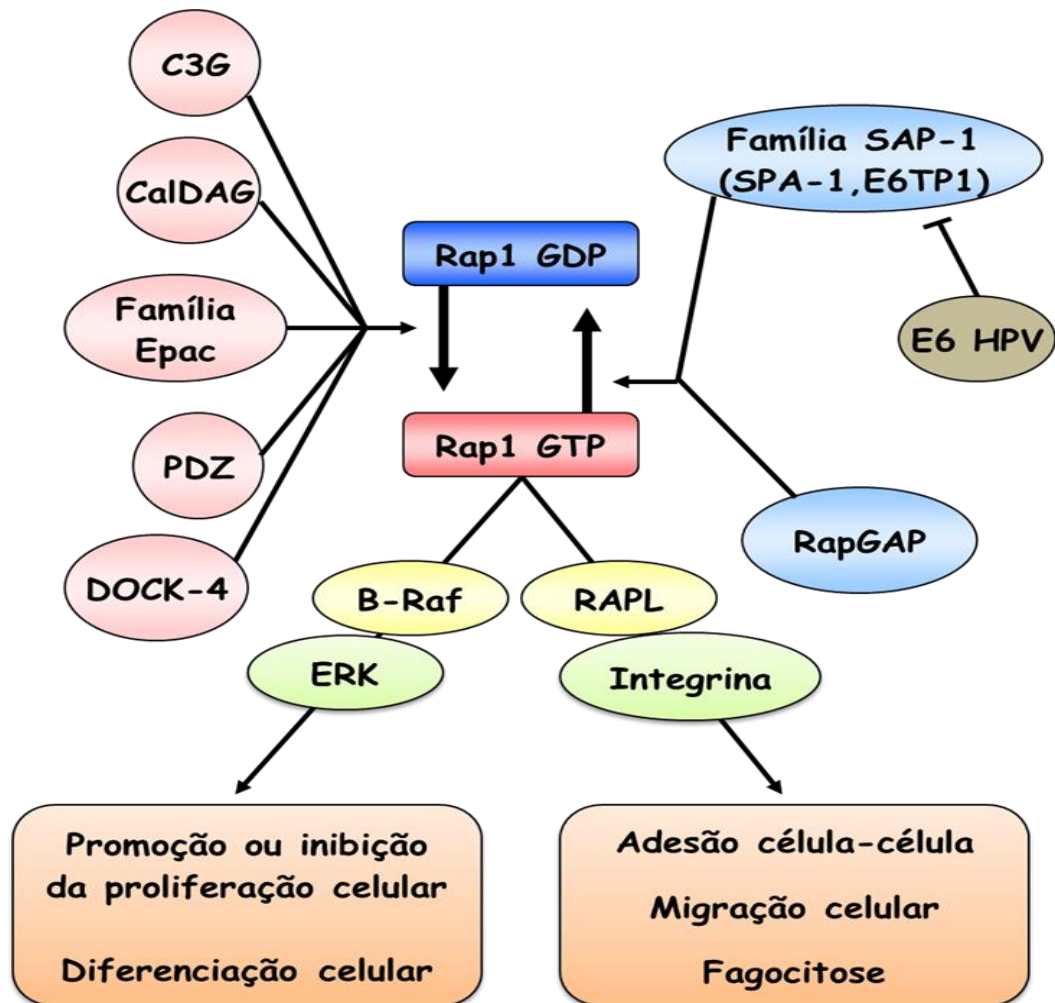


FIGURA 11 - Funções biológicas e regulação da proteína RAP1. A proteína RAP1 encontra-se na célula ou no estado inativo, RAP1GDP, ou ativo, RAP1GTP. A ativação é mediada pela ação de fatores permutadores do nucleotídeo guanina como C3G, CalDAG, Epac, PDZ e DOCK-4, e a inativação por proteínas ativadoras de GTPase como E6TP1, SPA-1 e RAP GAP. No estado ativo, RAP1 participa de importantes funções de diferenciação e regulação da proliferação celulares, por meio dos efetores moleculares B-Raf e ERK, além das relevantes funções mediadas por integrina de adesão e migração celulares e fagocitose. Anormalmente expressa, como resultado a ação da oncoproteína viral E6, RAP1 está envolvida na carcinogênese.

Fonte: Kometani *et al.*, 2004. (Houve alteração na ilustração, para fins didáticos).

2.6.3 – RAP1 e carcinogênese

A proteína RAP1 pode contribuir positivamente para sinalização mitogênica e exercer um efeito positivo ou negativo no crescimento e diferenciação celulares, dependendo do tipo de célula, e pode ter diferentes funções celulares dependendo de sua localização subcelular. Nas glândulas salivares e plaquetas, RAP1 tem sido localizada nos grânulos secretores, regulando a formação do grânulo e exocitose. Proteínas RAP1 também têm sido localizadas na organela de Golgi, membrana plasmática e em regiões perinucleares de células inflamatórias (Farina *et al.*, 2004; Frische e Zwartkruis, 2010).

Mais recentemente, RAP1 tem sido encontrada altamente expressa no núcleo de células do carcinoma de células escamosas. Nestas células, RAP1-GTP transloca-se para o núcleo, enquanto a RAP1-GDP é retida no citoplasma, numa distribuição perinuclear. Estas novas descobertas, sobre a translocação de RAP1-GTP para o núcleo celular, tornam RAP1 a segunda, dentre as mais de 100 pequenas proteínas ligantes de GTP, identificada no núcleo celular e sugerem que RAP1 ativada no núcleo das células do carcinoma de células escamosas desempenha papel no processo de transformação neoplásica (Mitra *et al.*, 2003; Farina *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2009; Frische e Zwartkruis, 2010).

Em outras neoplasias, a atividade de RAP1 pode estar aumentada, devido à hipoexpressão dos seus inibidores GAP, como descrito nos carcinomas de mama, tireoide e pâncreas, ou devido a hiperexpressão dos seus ativadores GEF, como encontrado nos carcinomas de pulmão, ovário, melanoma e, ultimamente, próstata (Hirata *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Nellore *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2009; Furstenau *et al.*, 2011).

Assim, torna-se relevante estudar alterações nos níveis de expressão da proteína RAP1 na neoplasia cervical associada à infecção por HPV, especialmente na NIC 1, que está associada à infecção produtiva pelo HPV, dada a influência direta ou ação das oncoproteínas virais nas vias de regulação da proteína RAP1, com o propósito de identificação de biomarcador diagnóstico, prognóstico ou terapêutico da NIC.

3 – METODOLOGIA

3.1 – Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais–COEP, Brasil (**CAAE-0397.0.203.245-09**) (Anexo 1).

3.2 – Amostras teciduais

Um total de 319 amostras de biópsias de colo uterino, fixadas por formalina e armazenadas em parafina, provenientes do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia do Instituto Hermes Pardini (IHP), no período entre 2006 e 2010, foram utilizadas neste estudo. Tais amostras incluíram, inicialmente, 65 amostras de mucosa não displásica (MND), alterada por inflamação e sem efeito citopático viral, 102 amostras de mucosa cervical alterada por lesão intraepitelial escamosa de baixo grau com infecção pelo HPV, correspondendo à NIC 1, 85 amostras de mucosa cervical alterada por lesão intraepitelial escamosa de alto grau, correspondendo à mucosa cervical com NIC 2/3 e, 67 amostras de mucosa cervical com carcinoma de células escamosas invasor (CCE).

Após análise dos critérios de inclusão e exclusão (vide tópico 3.3 – Critérios de inclusão e exclusão), foram realizadas, em sequência, a detecção e genotipagem do HPV, a imuno-histoquímica, a morfometria e a expressão gênica, de acordo com o delineamento metodológico abaixo (FIGURA 12):

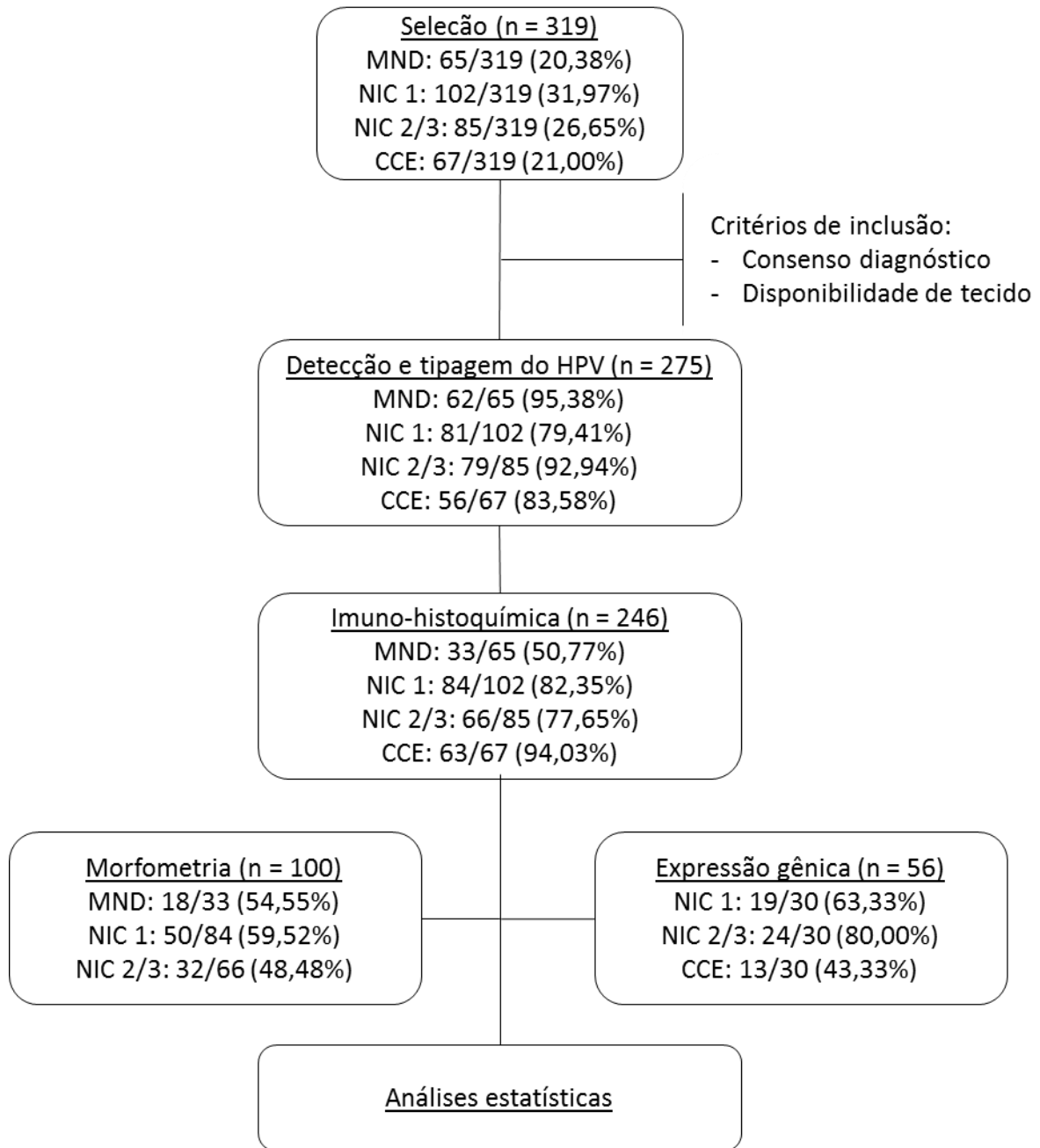


FIGURA 12 - Delineamento metodológico do estudo.

O cálculo do número de amostras foi estabelecido considerando-se a prevalência dos diagnósticos citopatológicos e histopatológicos de NIC 1 e NIC 2/3 associada à infecção por HPV no Brasil como 3% e 2%, de acordo com as Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero INCA (2011), respectivamente, com erro padrão de 1%.

3.3 – Critérios de inclusão e exclusão

Foram selecionados, aleatoriamente, laudos histopatológicos de biópsias de colo uterino, de peças de cirurgia de alta frequência e de histerectomia dos laboratórios de Anatomia Patológica do HC-UFMG e do IHP com os diagnósticos abaixo:

- a) Diagnóstico de cervicite crônica inespecífica (mucosa cervical com inflamação crônica, sem evidência de efeito citopático viral).
- b) Diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical (mucosa escamosa cervical com lesão intraepitelial de baixo ou de alto grau).
- c) Diagnóstico de carcinoma de células escamosas invasor do colo uterino (mucosa cervical com neoplasia epitelial escamosa invasora).

Após a seleção dos casos, as lâminas histológicas e os blocos de parafina correspondentes foram desarquivados e avaliados. Foram excluídos do estudo os casos com representatividade tecidual insuficiente, com estado desfavorável de fixação e com fragmentação acentuada da amostra.

3.4 – Revisão e classificação das amostras

As amostras de biópsias selecionadas aleatoriamente, conforme número previamente estabelecido no cálculo amostral, foram revisadas e reclassificadas, segundo as especificações abaixo, para maior uniformidade dos critérios:

a) Mucosa não displásica (MND): mucosa escamosa sem sinais de efeito citopático patognomônicos da infecção por HPV (atipias colicitóticas).

b) Mucosa cervical alterada por lesão intraepitelial: Segundo parâmetros do sistema Bethesda de 2001, as lesões cervicais não invasoras são subdivididas em dois grupos funcionais:

b1 – Neoplasia intraepitelial cervical de grau 1 (NIC 1): mucosas cervicais com alterações características da infecção pelo HPV.

b2 - Neoplasia intraepitelial cervical de graus 2 e 3 (NIC 2/3): mucosas cervicais com displasia acometendo os dois terços inferiores ou toda a espessura do epitélio escamoso, respectivamente, associadas ou não a alterações características da infecção pelo HPV.

c) Mucosa cervical alterada por carcinoma de células escamosas invasor (CCE): mucosa escamosa com maturação e polaridade epiteliais alteradas e com sinais de invasão do estroma conjuntivo por células escamosas atípicas isoladas ou em agrupamentos, sendo a atipia celular caracterizada, principalmente, pelo pleomorfismo nuclear.

3.5 – Imuno-histoquímica

3.5.1 – Reação de imuno-histoquímica

Lâminas com cortes parafinados de 5µm de amostras de mucosa escamosa cervical foram desparafinadas em xilol e reidratadas em álcool. A recuperação da antigenicidade foi feita pelo aquecimento a 90°C no vapor por 20 minutos em solução tampão 10mM Tris EDTA (pH 9,0) e em solução tampão de citrato de sódio (pH 6,0) (Shi *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2011).

A coloração para imuno-histoquímica foi feita com os anticorpos primários policlonais de coelho anti-RAP1 A+B humana (ab401814, Abcam) e anti-RAP1 GAP humana (ab32373, Abcam) e com anticorpos primários monoclonais de camundongo anti-p16INK4A humana (551154, BD Biosciences Pharmigen) e anti-Ki67 humana (550609, BD Biosciences Pharmigen). Foram realizados testes englobando as diluições recomendadas pelos fabricantes, com os dois sistemas de detecção LSAB-HRP (Dako) e Novolink (Novocastra), para definição da melhor diluição dos anticorpos. Posteriormente, foram definidas as diluições 1:25 e 1:40 para anti-RAP1 A+B humana (ab401814, Abcam) e anti-p16INK4A humana (551154, BD Biosciences Pharmigen), respectivamente, para uso com o sistema LSAB-HRP (Dako) e as diluições 1:120, 1:110, 1:200 e 1:75 para A+B humana (ab401814, Abcam), anti-p16INK4A humana (551154, BD Biosciences Pharmigen), anti-RAP1 GAP humana (ab32373, Abcam) e anti-Ki67 humana (550609, BD Biosciences Pharmigen), respectivamente, para uso com o sistema Novolink (Novocastra). A peroxidase endógena foi bloqueada pela solução bloqueadora. Foram adicionados 50µL do anticorpo primário, na diluição informada, por 50 minutos. Os cortes foram incubados com o sistema estreptavidina-biotina-peroxidase LSAB-HRP (Dako) e

sistema universal de detecção por polímeros Novolink (Novocastra), de acordo com as especificações do fabricante, e, posteriormente, com 200µL de solução reveladora contendo diamino-benzidina (DAB) (Dako) por 30 minutos. Os cortes foram imersos em Hematoxilina de Harris, para contra coloração, e avaliados por microscopia óptica.

3.5.2 – Parâmetros de classificação

3.5.2.1 – Avaliação óptica

A reatividade das amostras foi primeiramente classificada (Primeira classificação) de acordo com as respectivas categorias de expressão imunohistoquímica de p16: percentual das células reativas, distribuição das células reativas na espessura do epitélio e a intensidade da reação, em 10 campos de grande aumento (40X) do microscópio óptico convencional. O percentual de células reativas foi estratificado em: Nível 0: ausente; Nível 1 ou esporádico: imunorreatividade em menos de 5% das células; Nível 2 ou focal: imunorreatividade observada entre 5 e 25% das células e Nível 3 ou difuso: imunorreatividade em mais de 25% das células. A categoria distribuição foi estratificada em: 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 e Nível 3 ou toda a espessura do epitélio: quando células imunorreativas ocupam todo o epitélio. A categoria intensidade da reação foi graduada como: 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+ (FIGURA 13) (Klaes *et al.*, 2001).

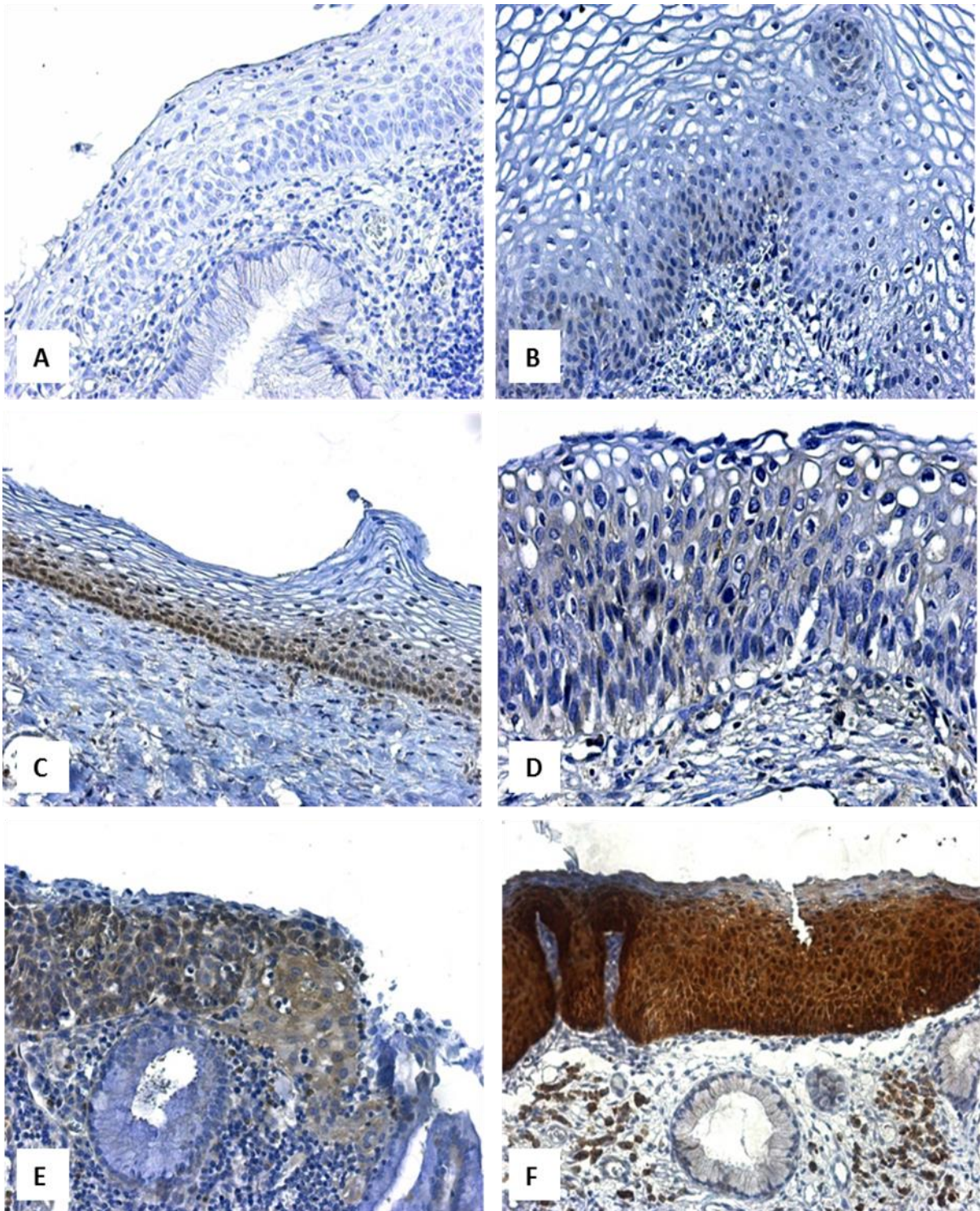


FIGURA 13 - Parâmetros imuno-histoquímicos da primeira classificação da expressão de p16 nos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3. A) Negativo: ausência de reatividade. B) Células esporádicas no terço basal do epitélio, fracamente reativas. C) Células focais no terço basal do epitélio, intermediariamente reativas. D) Células difusas em dois terços do epitélio, fracamente reativas. E) Células difusas em dois terços do epitélio, intermediariamente reativas. F) Células difusas em toda a espessura do epitélio, fortemente reativas (A-F: Aumento 200X).

Posteriormente, numa segunda classificação imuno-histoquímica, as amostras com diagnóstico de MND, NIC 1 e NIC 2/3 foram classificadas de acordo com os seguintes critérios de expressão de p16: Nível 0: ausente; Nível 1: fraca e média reatividade em células distribuídas esporádica e focalmente no terço basal do epitélio; Nível 2: média e forte reatividade em células distribuídas focal e difusamente no terço basal da espessura epitelial; e Nível 3: média e forte reatividade em células distribuídas difusamente em dois terços ou toda a espessura epitelial (Galgano *et al.*, 2010) (FIGURA 14).

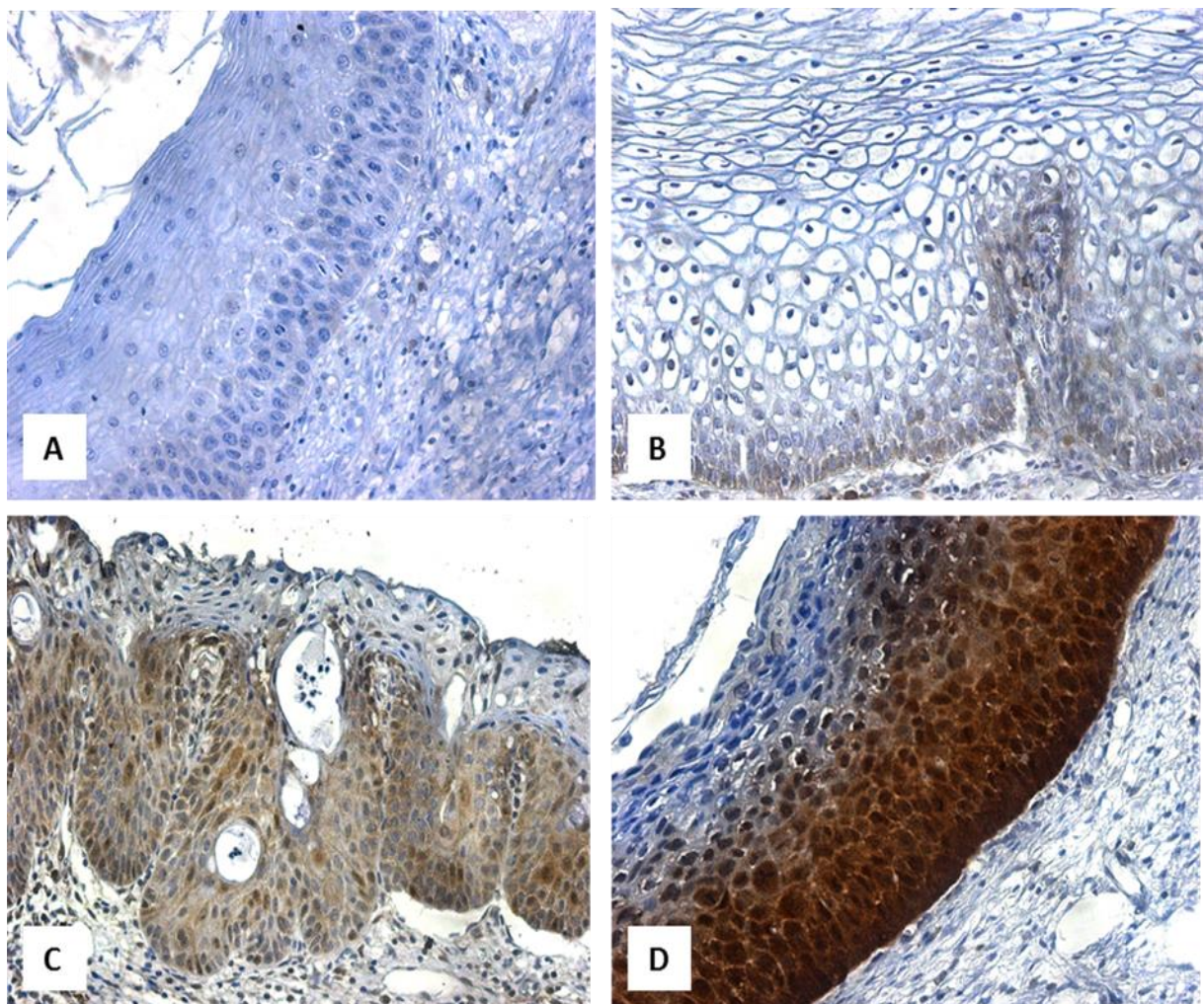


FIGURA 14 - Parâmetros imuno-histoquímicos da segunda classificação da expressão de p16 nos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3. A) Negativo: ausência de reatividade. B) Nível 1: fraca e média reatividade em células distribuídas esporádica e focalmente no terço basal do epitélio. C) Nível 2: média e forte reatividade em células distribuídas focal e difusamente no terço basal da espessura epitelial. D) Nível 3: média e forte reatividade em células distribuídas difusamente em dois terços ou toda a espessura epitelial (A-D: Aumento 200X).

Para o biomarcador Ki67, a segunda classificação imuno-histoquímica adotou os seguintes critérios nos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3: Nível 0: ausente; Nível 1: Reatividade em células dispersas do terço inferior do epitélio; Nível 2: Reatividade difusa no terço inferior do epitélio; Nível 3: Reatividade difusa em dois terços ou toda a espessura do epitélio (FIGURA 15).

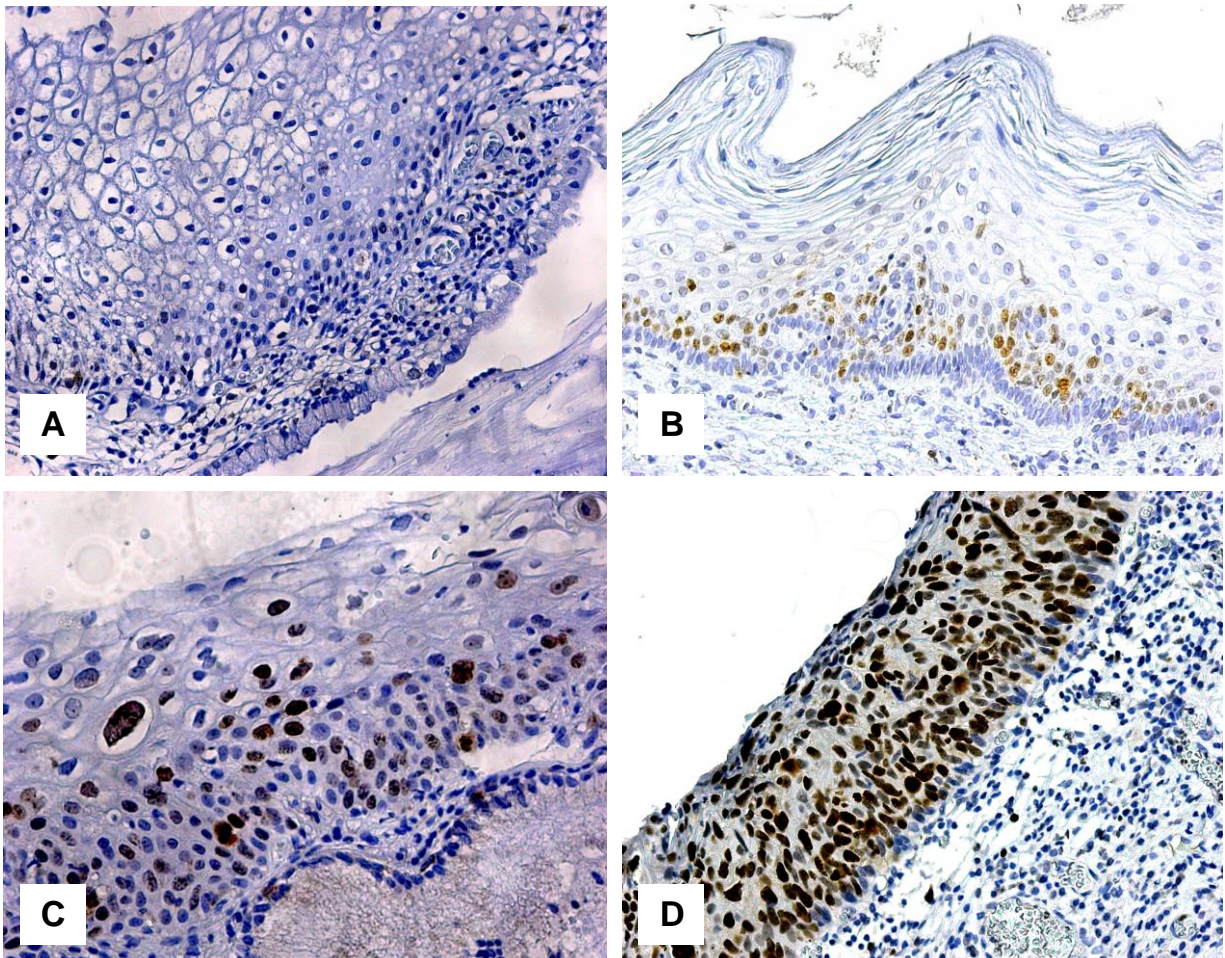


FIGURA 15 - Parâmetros imuno-histoquímicos da segunda classificação da expressão de Ki67 nos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3. A) Nível 0; B) Nível 1; C) Nível 2; e D) Nível 3. (A-D: Aumento 200X).

Separadamente, as amostras com diagnóstico de CCE, foram classificadas de acordo com os seguintes critérios da expressão imuno-histoquímica de p16: Nível 0: ausente; Nível 1: células coradas isoladamente; Nível 2: coloração presente em algumas ou mesmo maioria, mas não em todas as células; e Nível 3: positividade em todas as células neoplásicas (Cubilla *et al.*, 2011) (FIGURA 16).

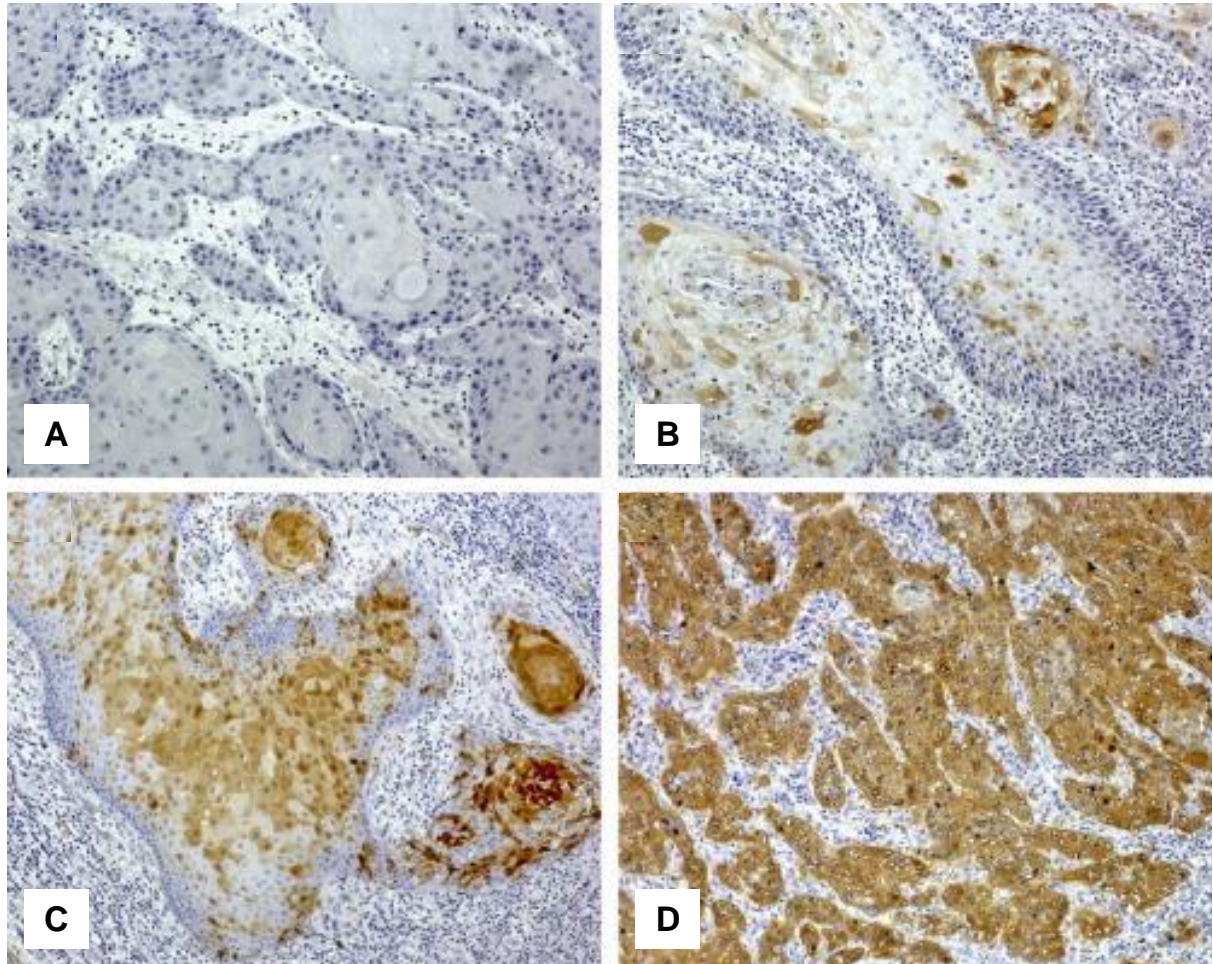


FIGURA 16 - Parâmetros imuno-histoquímicos da expressão de p16 para o grupo CCE. A - Negativo: ausência de reatividade em todas as células. B – Nível 1: células coradas isoladamente. C – Nível 2: coloração presente em algumas ou mesmo maioria, mas não em todas as células. D – Nível 3: positividade em todas as células neoplásicas (A-D: aumento 200X).

Fonte: Cubilla *et al.*, 2011.

Para finalidade das medidas de acurácia de testes diagnósticos, os critérios estabelecidos para análise de resultados de imuno-histoquímica para p16 foram empregados como padrão-ouro para avaliação comparativa com a expressão das proteínas RAP1, RAP1GAP e Ki67.

Também para finalidade das análises estatísticas comparativas entre grupos e de regressão logística, os níveis de reatividade imuno-histoquímica 0 (zero) e 1 foram considerados como correspondentes à expressão basal dos biomarcadores RAP1, RAP1GAP, p16 e Ki67 e os níveis de reatividade imuno-histoquímica 2 e 3 foram assumidos como hiperexpressão celular ou tecidual desses mesmos biomarcadores.

3.5.2.2 – Morfometria

Após análise óptica, as lâminas foram fotografadas, em sequência, no microscópico AXIO da ZEISS e as imagens analisadas, comparativamente, pelo software AxioVision, para caracterização e classificação morfométricas da expressão proteica de RAP1 e p16 pelo índice de intensidade relativa (RI) (Furstenau *et al.*, 2011). O índice de intensidade relativa (RI) de coloração da expressão proteica foi construído adaptando-se os critérios de FURSTENAU (2010). Primeiramente, foram capturadas imagens policromáticas das amostras selecionadas com os mesmos ajustes fixos de contraste, balanço das cores e luminosidade. Em seguida, as imagens foram processadas pelo software AxioVision. Foram selecionadas dez áreas de 1 mm² nas regiões de interesse do epitélio e do estroma e calculada a RI pela divisão da média aritmética da intensidade de pixels (I_{estroma}) do estroma pela média aritmética da intensidade de pixels do epitélio ($I_{\text{epitélio}}$), conforme a razão: $RI = I_{\text{estroma}} / I_{\text{epitélio}}$.

3.6 – Reação em cadeia da polimerase

3.6.1 – Desparafinação e extração de DNA

Cinco cortes de 10µm de cada amostra foram colocados em tubos de 1,5 mL e submetidos à Desparafinação e à extração do DNA com o kit QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

3.6.2 – Verificação da presença de inibidores

A fixação de tecidos com formaldeído tem como consequência a fragmentação dos ácidos nucleicos e o acúmulo de substâncias inibidoras da PCR. Assim sendo, para verificação da integridade do DNA e da presença de inibidores da PCR nas preparações de DNA extraído, as amostras foram testadas pela PCR utilizando-se os iniciadores PC03 (5'-ACACAACACTGTGTTCACTAGC-3') e PC04 (5'-

CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'), que resulta na amplificação de um fragmento de 110 pb do gene de β -globina humano (Zehbe e Wilander, 1996; Husnjak *et al.*, 2000; Haws *et al.*, 2004).

Para amplificação do fragmento de 110 pb do gene β -globina humano foram utilizados 2 μ L de DNA extraído de amostra parafinada; 2 μ L de tampão STR10X Promega (500mM KCl, 100mM Tris-HCl, 15mM MgCl₂, 1% Triton X-100 e 2mM dNTP) ; 0,3 μ L de Gold Taq polimerase Promega (5U/ μ L); 1 μ L do iniciador senso (10 μ M); 1 μ L de iniciador anti-senso (10 μ M) e H₂O até o volume final de 20 μ L.

A amplificação ocorreu da seguinte forma: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos, como se segue: 95°C por 1 minuto; pareamento a 53°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 2 minutos; e um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Dez μ L do produto da PCR foram homogeneizados com 2 μ L de tampão de amostra 10X (azul de bromofenol a 0,25%; xilenocianol a 0,25%; Ficoll 400 a 15% em 5X TBE) e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% em tampão TBE 1X (Tris-Borato-EDTA) a uma voltagem constante de 100V por cerca de 30 a 40 minutos. Posteriormente, o gel foi corado com nitrato de prata como se segue: o gel foi submerso em 150mL de solução fixadora (contendo 750 μ L de ácido acético, 15mL de etanol e 150mL de água) e 0,30g de nitrato de prata (0,30g de AgNO₃ e 150mL de água) por no mínimo 10 minutos. Logo em seguida foi lavado com água destilada e evidenciadas as bandas em solução reveladora contendo 4,5g de hidróxido de sódio (NaOH 0,75M), 450 μ L de formaldeído 0,1M e água q.s.p. para 150mL. Todos os géis foram digitalizados em *scanner* HP.

3.6.3 – Detecção do DNA viral nas amostras por *nested-PCR*

Para determinação da presença do genoma do HPV, as preparações de DNA extraídos das biópsias cervicais foram submetidas à *nested-PCR*.

A *nested-PCR* foi utilizada com o objetivo de aumentar a sensibilidade e especificidade na detecção do genoma de HPV nas amostras. Neste método, em uma primeira reação foram utilizados os iniciadores degenerados para amplificação de fragmentos de 450 pb do gene de L1 de diversos tipos de HPV denominados

MY11 e MY09. Como controle positivo da reação de amplificação, foi utilizado o DNA extraído de células HeLa ou células degeneradas (ambas as linhagens possuem genoma de HPV integrado ao genoma celular) e, em seguida, uma segunda reação (*nested*) com os iniciadores genéricos do papilomavírus GP5+ (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3') e GP6+ (5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATA TTC-3'), que amplificam fragmentos de 150 pb internos aos fragmentos de 450 pb amplificados na primeira reação (Zehbe e Wilander, 1996; Husnjak *et al.*, 2000; Haws *et al.*, 2004).

Na reação preconizada acima, contendo os iniciadores MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3') e MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'), onde M corresponde às bases A/C e W às bases A/T e R e às bases A/G, foram utilizados 10 μ L de DNA extraído das amostras parafinadas; 2 μ L de tampão STR Promega (500mM KCl, 100mM Tris-HCl, 15mM MgCl₂, 1% Triton X-100 e 2mM dNTP); 0,3 μ L de Gold Taq polimerase Promega (5U/ μ L); 1 μ L de cada iniciador (10 μ M) e H₂O até o volume final de 20 μ L. A amplificação ocorreu da seguinte forma: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos como se segue: 95°C por 1 minuto; pareamento a 53°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 1 minuto; e um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Na segunda reação feita com os iniciadores GP5+ e GP6+, para amplificação dos fragmentos de 150 pb, foram utilizados 2 μ L de DNA da primeira reação; 2 μ L de tampão STR Promega (500mM KCl, 100mM Tris-HCl, 15mM MgCl₂, 1% Triton X-100 e 2mM dNTP) ; 0,3 μ L de Gold Taq polimerase Promega (5U/ μ L); 2 μ L de cada iniciador (10 μ M) e H₂O até o volume final de 20 μ L. A amplificação ocorreu da seguinte forma: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos como se segue: 95°C por 1 minuto; pareamento a 40°C por 2 minutos; extensão a 72°C por 90 segundos e um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

A visualização dos produtos da *nested*-PCR foi realizada para todas as amostras e controles negativos e positivos por meio de eletroforese em géis de poliacrilamida em solução de TBE 1%. A corrida eletroforética dos géis foram realizadas em correntes contínuas no equipamento para eletroforese.

3.6.4 – Genotipagem com iniciadores tipo específicos

Após a identificação das amostras positivas para o DNA de HPV, foi realizada a genotipagem dos HPV 16, 18, 31, 33, 52 e 58 utilizando-se iniciadores tipo específicos.

Nas reações para amplificação da junção dos genes E6/E7 dos HPV16; 18; 31; 52 e 58, um único iniciador anti-senso (denominado E7 CR3) foi utilizado com os iniciadores senso específicos para cada tipo de HPV (TABELA 1), como relacionado a seguir:

TABELA 1
Iniciadores utilizados na *nested*-PCR para genotipagem do HPV

Iniciador	Alvo	Nucleotídeos	HPV	Tamanho
E7 CR3	E6/E7	5'- TGAGCTGTCGCTTAATTGCTC -3'	Variável	Variável
16SF1	E6/E7	5' TGTATGTCTTGTTGCAGATCATCA-3'	16	149
18SF2	E6/E7	5'- CCATTCGTGCTGCAACCG – 3'	18	177
31SF1	E6/E7	5'- CTATTAGATGTATGATTTGTCAAACG-3'	31	249
52SF2	E6/E7	5'- CTATTAGATGTATGATTTGTCAAACG-3'	52	300
58SF2	E6/E7	5- ATGTAAAGTGTGCTTACGATTGC-3'	52	300

Nas reações para genotipagem, foram utilizados os iniciadores 33F (5'- ATGATAGATGATGTAACGCC-3') e 33 R (5'- GCACACTCCATGCGTATCAG-3'), que amplificam um fragmento de 456 pb da região de junção entre os genes E1 e E2 de HPV33.

Na reação contendo os iniciadores de cada HPV foram utilizados, 2µL de DNA extraído das amostras parafinadas; 2µL de tampão STR Promega (500mM KCl, 100mM Tris-HCl, 15mM MgCl₂, 1% Triton X-100 e 2mM dNTP); 0,3µL de Gold Taq polimerase Promega (5U/µL); 1µL de cada iniciador (10µM) e H₂O até o volume final de 20µL.

3.6.5 – Genotipagem por sequenciamento direto dos fragmentos do gene L1

Fragments de 150 pb do gene L1, amplificados a partir de amostras cervicais com HPV, foram submetidos à eletroforese preparativa em gel de agarose a 2,0% corado com GelRed (Biotium). Posteriormente, as bandas de 150 pb foram recortadas do gel com o auxílio de bisturi para posterior extração de DNA pelo Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Em seguida, os DNAs purificados foram quantificados visualmente em gel de agarose a 2% corado com GelRed (Biotium), contendo padrão de DNA com concentração conhecida.

Cerca de 100ng do amplicon de 150 pb purificado foram utilizados em reação de sequenciamento com kit DYEnamic ET Dye Terminator (GE Healthcare) contendo 5pmoles do iniciador GP5+ ou GP6+ e 5 μ L de Dye Terminator, em reação com volume final de 10 μ L. As condições de reação para o sequenciamento, foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos como se segue: 95°C por 10 segundos; pareamento a 40°C por 15 segundos; extensão a 60°C por 60 segundos.

Após precipitação das reações de sequenciamento, para eliminação dos nucleotídeos não incorporados. A leitura foi feita no sequenciador automático de DNA Mega Bace 1000TM (GE HealthCare Life Sciences).

Os *contigs* foram montados através da ferramenta PHPH disponibilizada na internet para análise da qualidade de eletroferograma e montagem dos *contigs* (<http://www.biomol.unb.br/phph>). As sequências nucleotídicas foram analisadas através dos programas BLAST N (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.7 – Transcrição reversa e PCR quantitativa em tempo real

3.7.1 – Desparafinação e extração de RNA

Cinco cortes de 10 μ m de cada amostra foram colocados em microtubos (Eppendorf) de 1,5mL e submetidos à Desparafinação e à extração do RNA com o kit QIAamp RNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) de acordo com todas as instruções do fabricante.

A verificação da concentração de RNA das amostras foi realizada por meio de leituras espectrofotométricas em 260nm (A_{260}) e em 280nm (A_{280}) no

espectrofotômetro NanoDrop 1000 (NanoDrop) e a determinação da qualidade do RNA foi inferida pela razão A_{260}/A_{280} , com valores entre 1,8 e 2,0 indicando boa qualidade do RNA. As amostras de RNA extraídos foram armazenadas a -70°C até o momento do uso.

3.7.2 – Reação de transcrição reversa

As reações de transcrição reversa, foram realizadas utilizando a quantidade de 100 ng de RNA total por tubo, como se segue: 4 μL de tampão 5x da transcriptase reversa; 0,5 μg de *random primer* na concentração (Invitrogen); 3mM de MgCl_2 (Invitrogen); 0,5mM de dNTPs (Invitrogen); 20U/ μL de RNasin; 40U/ μL das enzimas IMPROM II (Promega) ou SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) e água DEPC (Dimetilpirocarbonato), com volume final de 20 μL .

A reação ocorreu em duas etapas:

1^a etapa: tubos contendo *random primer*, dNTPs, água e RNA, foram colocados no termociclador a 70°C por 5 minutos e, posterior foram resfriados em banho de gelo por mais 5 minutos.

2^a etapa: foi adicionada enzima IMPROM II ou SuperScript III Reverse Transcriptase, RNasin e água aos tubos da 1^a etapa. Em seguida, os tubos foram incubados no termociclador por 5 minutos a 25°C , 60 minutos a 42°C e 15 minutos a 70°C .

3.7.3 – Seleção e controle de qualidade *in silico* dos iniciadores

Os pares de iniciadores (senso e anti-senso) para amplificação das regiões de interesse foram desenhados a partir da sequência de DNA dos genes alvos RAP1, isoforma A; RAP1, isoforma B; p16^{INK4A}; RAP1GAP e C3G, e dos genes constitutivos β -actina, GAPDH e RLP29, conforme aproximação dos critérios: tamanho de 20 pares de bases; temperatura de pareamento de 59°C ; conteúdo de bases guanina (G) e citosina (C) de 50%; tamanho de amplificado entre 80 e 150 pares de bases (pb).

Subsequentemente, todos os iniciadores escolhidos foram analisados e validados *in silico* para verificar a presença de estruturas secundárias ou

polimorfismos. Foram utilizados os programas BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) e RTPPrimerDB (www.rtpprimerdb.org).

3.7.4 – Otimização das reações quantitativas em tempo real

As concentrações dos iniciadores senso e anti-senso foram estabelecidas por matriz de iniciadores em qPCR com cDNA proveniente de amostra do grupo controle. Para cada reação, foram analisadas as curvas de dissociação para determinar o maior ΔR_n em um menor C_T .

A determinação da melhor temperatura de pareamento (*annealing*) dos iniciadores selecionados e a análise dos amplificadores em gel de poliacrilamida foram feitas após reações de RT-qPCR que utilizaram 2 μ L de cDNA de amostras com melhor razão A_{260}/A_{280} , 2 μ L de tampão STR10X Promega (500mM KCl, 100mM Tris-HCl, 15mM MgCl₂, 1% Triton X-100 e 2mM dNTP) ; 0,3 μ L de Taq Gold polimerase Promega (5U/ μ L); 1 μ L do iniciador senso (10 μ M); 1 μ L de iniciador anti-senso (10 μ M) e H₂O até o volume final de 20 μ L. Em seguida foram realizadas as etapas para a amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 12 minutos, 35 ciclos com as etapas: 95°C por 1 minuto; pareamento a 58°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 7 minutos; e um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

3.7.5 – Validação da eficiência de amplificação dos genes alvos e dos controles endógenos

A validação da eficiência da amplificação dos genes alvos e das referências endógenas, para determinação da quantificação relativa da expressão gênica pelo método C_T Comparativo ou Delta-Delta C_T ($\Delta\Delta C_T$), foi realizada pelo estabelecimento de curvas padrões por qPCR (Anexos 2 e 3), com o sistema do corante SYBR Green (Applied Biosystems), no aparelho Applied Biosystems StepOne™, em triplicatas para todos os pares de iniciadores (Livak e Schmittgen, 2001). Além da quantificação relativa da expressão gênica pelo método C_T

Comparativo ou Delta-Delta CT ($\Delta\Delta C_T$), foi utilizada a estratégia de quantificação da diferença da expressão gênica (rER) (Scheffe *et al.*, 2006).

3.7.6 – Quantificação relativa da expressão de genes alvos celulares

A quantificação de mRNA das proteínas alvos RAP1, isoformas A e B, p16^{INK4A}, RAP1GAP, C3G, e dos genes constitutivos β -actina, GAPDH e RLP29, como controles endógenos, após transcrição reversa e síntese de cDNA, foi realizada, utilizando-se os iniciadores específicos como descrito na TABELA 2 abaixo (Hirata *et al.*, 2004; Santin *et al.*, 2005; Cicinnati *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2009; Rho *et al.*, 2010):

TABELA 2
Iniciadores utilizados na qPCR para quantificação de mRNA celular

Iniciador	Alvo	Nucleotídeos	Tamanho (pb)	Produto (pb)
RAP1A F	RAP1A	5' - CGGGTTAAGGACACGGAAG -3'	19	82
RAP1A R	RAP1A	5' - CTTTGCCAACACTCGCTCA -3'	20	
RAP1B F	RAP1B	5' - CGTGGCGCCTAGAGTAGC -3'	18	99
RAP1B R	RAP1B	5' - TGCAAGCTTGTCAAAACCTAGT -3'	22	
p16 F	p16	5' - CCCAAACGCACCGAATAGTTAC -3'	21	104
p16 R	p16	5' - ATTCCAATTCCCCTGCAAAC -3'	21	
RAP1GAP F	RAP1GAP	5' - GCACTTTCTCGGCAAGGAGCATT -3'	24	149
RAP1GAP R	RAP1GAP	5' - TGACATCATGGTATGTCCGGCACT -3'	24	
C3G F	C3G	5' - CTGTGGCTTCCAGGTCTC A -3'	19	77
C3G R	C3G	5' - CAGGGCACTGACAACCTTCCT -3'	20	
β -actina F	β -actina	5' - CTGGGAGTGGGTGGAGGC -3'	20	120
β -actina R	β -actina	5' - TCAACTGGTCTCAAGTCA GTG -3'	20	
GAPDH F	GAPDH	5' - TGCACCACCAACTGCTTAGC -3'	20	87
GAPDH R	GAPDH	5' - GGCATGGACTGTGGTCATGAG -3'	20	
RLP29 F	RLP29	5' - GCGTGTGTTGACCCTAT TTC -3'	20	120
RLP29 R	RLP29	5' - GTGTGTGGTGTGGTTCTTGG -3'	20	

Fonte: Hirata *et al.*, 2004; Santin *et al.*, 2005; Cicinnati *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2009; Rho *et al.*, 2010.

Para as reações, foram adicionados 1 μ L da primeira fita de cDNA das amostras à 12,5 μ L de Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 2,5 μ L

de cada um dos iniciadores específicos (10 μ M) e água DEPC, para o volume final de 25 μ L. As condições da corrida no aparelho Applied Biosystems StepOne™, das amostras em duplicata, foram feitas como se segue: um ciclo a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 58°C por um minuto para todos os alvos. A curva *melting* foi feita a 95°C por 15 segundos, seguido de 60°C por um minuto e 95°C por 15 segundos.

3.7.7 – Quantificações absoluta da carga viral e relativa da expressão dos genes virais E6 e E7 do HPV16 e do HPV18

Para a quantificação absoluta da carga viral e a quantificação relativa da expressão dos genes virais E6 e E7 dos tipos HPV16 e HPV18 por qPCR, foram utilizados procedimentos de extração de DNA e RNA conforme descrito nos itens 6.1 e 7.1. A reação de transcrição reversa, a seleção e o controle de qualidade *in silico* dos iniciadores para a qPCR seguiram os mesmos critérios dos itens 7.2 e 7.3. A otimização das reações de qPCR para obtenção das melhores condições de concentração dos iniciadores e temperaturas dos ciclos seguiu os mesmos parâmetros do item 7.4.

3.7.8 – Construção da curva padrão para quantificação absoluta

As curvas padrão foram construídas utilizando-se genoma completo de HPV 16 e HPV 18 inseridos em vetores plasmidiais pRL2 e pUC18/19 (gentilmente cedidos pela Dra. Alison McBride, NIH, USA), respectivamente, e cDNA de amostra do grupo MND, após transcrição reversa. Os plasmídeos pRL2 e pUC18/19 foram linearizados após digestão enzimática com as enzimas BamHI e SmaI nos vetores.

As concentrações das amostras com DNA de HPV 16 e 18 e das amostras com cDNA foram determinadas por espectrofotometria e convertidas em número de cópias nas concentrações de 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³ e 10² por nanograma de DNA celular (Anexos 4 e 5). Essas concentrações reproduzem valores basais de carga viral de HPV 16 e HPV 18 encontrados nas infecções persistentes (Xi *et al.*, 2009).

3.7.9 – Quantificações absoluta da carga viral e relativa da expressão dos mRNAs virais E6 e E7 do HPV16 e do HPV18

A quantificação da expressão de mRNA das proteínas virais E6 e E7 do HPV16 e HPV18 e dos controles endógenos β -actina e GAPDH foram realizadas utilizando-se os iniciadores específicos descritos na TABELA 3 abaixo (Cattani *et al.*, 2009).

TABELA 3

Iniciadores utilizados na qPCR para quantificação de mRNA e DNA viral

Iniciador	Alvo	Nucleotídeos	Tamanho (pb)	Produto (pb)
HPV16E6F	E6HPV16	5'-GCACCAAAAAGAGAACTGCAATGTT-3'	24	152
HPV16E6R	E6HPV16	5'- AGTCATATACCTCAC GTCGCAGTA -3'	24	
HPV16E7F	E7HPV16	5'- CAAGTGTGACTCTACGCTTCGG -3'	22	81
HPV 16E7R	E7HPV16	5'- GTGGCCCATTAACAGGTCTTCCAA -3'	24	
HPV18E6F	E6HPV18	5'- CTATA GAGGCCAGTGCCATTTCG -3'	22	79
HPV18E6R	E6HPV18	5'- TTATACTTGTGTTTCTCTG CGTCG -3'	24	
HPV18E7F	E7HPV18	5'- TAATCATCAACATTTACCAGCCCG -3'	24	113
HPV 18E7R	E7HPV18	5'- CGTCTGCTGAGCTTTCTACTACTA -3'	24	
β -actina F	β -actina	5'-CTGGGAGTGGGTGGAGGC-3'	20	120
β -actina R	β -actina	5'-TCAACTGGT CTCAAGTCAGTG-3'	20	
GAPDH F	GAPDH	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC -3'	20	87
GAPDH R	GAPDH	5'- GGCATGGACTGTGGTCATGAG -3'	20	

Fonte: Cattani *et al.*, 2009

Para as reações, foram adicionados 1 μ L da primeira fita de cDNA das amostras à 12,5 μ L de Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 2,5 μ L de cada um dos iniciadores específicos (10 μ M) e água DEPC, para o volume final de 25 μ L. As condições da corrida no aparelho Applied Biosystems StepOne™, das amostras em duplicata, foram feitas como se segue: um ciclo a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 58°C por um minuto para todos os alvos. A curva *melting* foi feita a 95°C por 15 segundos, seguido de 60°C por um minuto e 95°C por 15 segundos.

3.8 – Análises estatísticas

As análises estatísticas do estudo consideraram, para aplicação dos testes estatísticos na determinação da significância estatística e do grau de associação entre variáveis, as seguintes definições:

1 – Variáveis categóricas nominais: aquelas que ocorrem em categorias sem qualquer ordem inerente. No estudo, foram consideradas variáveis categóricas dicotômicas a presença ou a ausência de DNA de HPV.

2 – Variáveis categóricas ordinais: aquelas que possuem certa ordem inerente ou hierarquia. No estudo, foram consideradas variáveis categóricas ordinais todas as variáveis das três classificações imuno-histoquímicas por microscopia óptica convencional, especificamente o percentual das células imunorreativas, a distribuição das células imunorreativas no epitélio e a intensidade da reação observada para os biomarcadores RAP1, RAP1GAP, p16 e Ki67.

3 – Variáveis quantitativas contínuas: aquelas que podem assumir qualquer valor em um *continuum*. No estudo, foram considerados variáveis quantitativas contínuas os dados da morfometria (RI) e os dados das qPCR para expressões gênicas celular e viral.

Adicionalmente, para as análises estatísticas, foram definidos os testes estatísticos do Qui-quadrado (χ^2) e exato de Fisher para comparação das proporções dos grupos das variáveis categóricas nominais e ordinais da detecção e genotipagem do HPV e da imuno-histoquímica. O teste T, seguido do pós-teste Tukey, foi utilizado para comparação entre as médias das variáveis quantitativas contínuas. Os coeficientes de correlação de Spearman e de correlação de Pearson com regressão linear foram utilizados para relação entre variáveis categóricas ordinais e variáveis quantitativas contínuas, respectivamente. O teste ANOVA com aplicação do pós-teste Tukey foi empregado para verificação da significância entre duas ou mais variáveis quantitativas contínuas.

A TABELA 4 abaixo sintetiza todos os testes estatísticos utilizados no estudo, de acordo com a escala de mensuração das variáveis, a significância estatística do teste e a associação estatística.

TABELA 4
Testes estatísticos utilizados no estudo.

Escala de mensuração das variáveis	Significância estatística	Associação
Duas variáveis categóricas ordinais	Qui-quadrado (X^2) Exato de Fisher	Coeficiente de correlação de Spearman
Uma variável categórica nominal e uma variável categórica ordinal	Qui-quadrado (X^2) Exato de Fisher	Coeficiente de correlação de Spearman
Duas variáveis quantitativas contínuas	ANOVA com pós teste Tukey	Coeficiente de correlação de Pearson com regressão linear

Para essas análises estatísticas comparativas das proporções dos resultados da imuno-histoquímica entre os grupos MND, CIN 1, CIN 2/3 e CCE, os níveis 0 (zero) e 1 (um) de reatividade foram considerados como expressão basal dos biomarcadores RAP1, RAP1GAP, p16 e Ki67 e os níveis 2 (dois) e 3 (três) de reatividade foram assumidos como hiperexpressão celular ou tecidual desses mesmos biomarcadores.

De acordo com Hosmer (Hosmer Jr *et al.*, 2013), para a análise da relação entre as variáveis independentes, numéricas ou categóricas (níveis de expressão imuno-histoquímica do biomarcador RAP1), e a variável resposta categórica (grupos MND, CIN 1, CIN 2/3), empregou-se a análise de regressão logística e, assumindo que a variável resposta tivesse distribuição de probabilidade binomial $Y_i \sim B(m_i, \pi_i)$, tal que $P(Y_i = y_i) = \binom{m_i}{y_i} \pi_i^{y_i} (1 - \pi_i)^{m_i - y_i}$, foi utilizada a função de ligação logito $\ln\left(\frac{\pi_i}{1 - \pi_i}\right) = \beta_0 + \beta_i x_i$ e o modelo matemático de regressão logística ordinal estereótipo proposto por Anderson (Anderson, 1984). O método da máxima verossimilhança foi usado para estimativa dos parâmetros β_0 e β_i .

A interpretação dos parâmetros β_0 e β_i do modelo de regressão logística foi obtida comparando-se a probabilidade de sucesso com a probabilidade de fracasso, usando a função *odds ratio* - OR (razão de chances). Essa função, obtida a partir da

razão entre essas duas probabilidades, foi representada pela equação: $OR = g(x) = \frac{\pi(x)_i}{1 - \pi(x)_i} = e^{\beta_0 + \beta_i x_i}$.

As relação entre variáveis seguiram as seguintes orientações: para $\beta_i > 0$, OR foi considerada maior que 1 ($OR > 1$) e para $\beta_i < 0$, OR foi considerada menor que 1 ($OR < 1$).

Posteriormente à estimativa dos coeficientes, a significância das variáveis no modelo foi avaliada pelos testes de Wald e da Razão da Verossimilhança e a seleção das variáveis seguiu o método *Stepwise*. O teste de Wald, obtido por comparação entre a estimativa de máxima verossimilhança do parâmetro β_i e a estimativa de seu erro padrão, foi utilizado para seleção de variáveis quando a probabilidade foi menor que 0,25 ($p < 0,25$). A estatística do teste Wald, sob a hipótese nula $H_0: \beta_i = 0$, tem distribuição normal padrão.

O teste da Razão da Verossimilhança (G) comparou os valores da estatística *Deviance* (D) com e sem a variável selecionada no modelo, conforme a descrição: $G = D(\text{modelo sem a variável}) - D(\text{modelo com a variável})$. Sob a hipótese nula $H_0: \beta_i = 0$, a estatística G , que tem distribuição qui-quadrado com 1 grau de liberdade, foi utilizada para definição das variáveis do modelo final quando a probabilidade foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas somente quando $p < 0,05$, com intervalo de confiança de 95%. Os *softwares* Microsoft Office Excel (Microsoft) e Minitab 17 (Minitab) foram utilizados para tabulação e análises estatísticas descritiva e comparativa dos dados do estudo, além das medidas de acurácia. O pacote VGAM do *software* estatístico R (Versão 2.15.3; <http://www.r-project.org>) foi utilizado para a análise de regressão logística ordinal.

4 - RESULTADOS

4.1 – Dados demográficos

Um total de 319 amostras de biópsias do colo uterino foi selecionado para o estudo. Cerca de 35% dessas amostras foram obtidas de diversas cidades do Estado de Minas Gerais. Os outros dois estados com maior percentual de casos foram a Bahia e o Pará (FIGURA 17). A idade das pacientes apresenta variação entre 18 e 74 anos, com média de 38 anos e mediana de 36 anos.

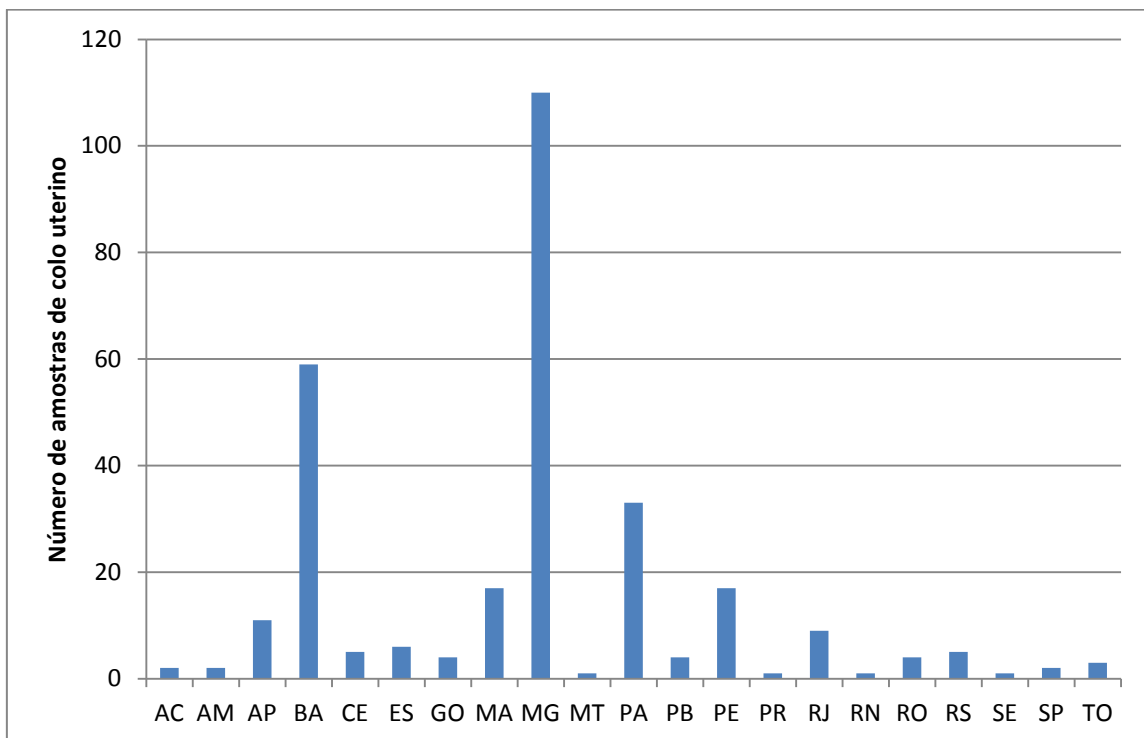


FIGURA 17 - Distribuição da frequência do número de amostras do colo uterino selecionadas para o estudo por Estados brasileiros.

4.2 – Detecção e genotipagem do HPV

Do total de 319 amostras de biópsias cervicais selecionadas para o estudo, as reações de *nested* PCR foram realizadas com sucesso e boa qualidade, a partir da extração de DNA de tecido armazenado em parafina, em 275 amostras ou 86,20% do referido total. Apenas 44 casos ou 13,80% do total de 319 amostras, por motivos variados, apresentaram insucesso ou resultado inadequado nas reações.

A TABELA 5 abaixo sintetiza os resultados das reações de *nested* PCR para detecção do HPV:

TABELA 5

Detecção do DNA do HPV por *nested* PCR nas amostras dos grupos MND, NIC 1, NIC 2/3 e CCE

RESULTADO	GRUPO				
	MND	NIC 1	NIC 2/3	CCE	TOTAL
	N (% resultado) (% grupo)	N (% resultado) (% grupo)	N (% resultado) (% grupo)	N (% resultado) (% grupo)	N (% resultado) (% grupo)
Negativo	45	36	24	14	119
	(37,82)	(30,25)	(20,17)	(11,76)	(100,00)
	(72,58)	(44,44)	(31,58)	(25,00)	(43,27)
Positivo	17	45	52	42	156
	(10,90)	(28,85)	(33,33)	(26,92)	(100,00)
	(27,42)	(55,56)	(68,42)	(75,00)	(56,73)
TOTAL	62	81	76	56	275
	(22,55)	(29,45)	(27,64)	(20,36)	(100,00)
	(100,00)	(100,00)	(100,00)	(100,00)	(100,00)

O DNA do HPV foi detectado em 156 biópsias ou 56,73% do total de 275 amostras. Todos os grupos, incluindo o MND, apresentaram casos positivos. As maiores proporções de positividade foram encontradas nos grupos NIC 2/3 e CCE, correspondendo a 68,42% e 75,00% dos casos, respectivamente. O grupo NIC 1 apresentou menor percentual (55,56%) de casos positivos para o DNA do HPV. Surpreendentemente, uma minoria expressiva do grupo MND, equivalente a 27,42% dos casos, foi positiva para a presença do DNA do HPV.

Entre os tipos de HPV de alto risco pesquisados nesse trabalho, os mais frequentes foram os tipos HPV16, HPV18 e HPV31, correspondendo a 63,64%, 31,82% e 4,55% do total de 44 casos, respectivamente. A TABELA 6 abaixo apresenta a divisão dos tipos mais prevalentes de HPV do estudo por grupo de diagnóstico histopatológico.

TABELA 6

Genotipagem do HPV nas amostras dos grupos MND, NIC 1, NIC 2/3 e CCE por PCR específica, sequenciamento direto e qPCR

RESULTADO	GRUPO				
	MND	NIC 1	NIC 2/3	CCE	TOTAL
	N (% resultado) (% grupo)	N (% resultado) (% grupo)	N (% resultado) (% grupo)	N (% resultado) (% grupo)	N (% resultado) (% grupo)
HPV16	1 (3,57) (20,00)	5 (17,86) (71,42)	13 (46,43) (68,42)	9 (32,14) (69,23)	28 (100,00) (63,64)
HPV18	4 (28,57) (80,00)	1 (7,14)	6 (42,86) (31,58)	3 (21,43) (23,08)	14 (100,00) (31,82)
HPV31	-	1 (50,00)	-	1 (50,00)	2 (100,00)
	-	(14,29)	-	(7,68)	(4,55)
TOTAL	5 (11,36) (100,00)	7 (15,91) (100,00)	19 (43,18) (100,00)	13 (29,55) (100,00)	44 (100,00) (100,00)

Destacaram-se, nos resultados acima, a predominância do HPV16 nos grupos NIC 1 (71,42%), NIC 2/3 (68,42%) e CCE (69,23%) e a também surpreendente predominância do HPV18 nas amostras do grupo MND, com proporção de 80,00%.

4.3 – Carga viral e expressão gênica do HPV16 e do HPV18

Houve, em relação ao diagnóstico histopatológico da lesão cervical, maior média de carga viral no grupo CCE, tanto para HPV16, quanto para HPV18, com valores de 4,22 e 6,70 Log₁₀ cópias de HPV/ng de DNA, respectivamente. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando se compararam as médias das cargas virais do HPV16 e do HPV18 entre os grupos NIC 1, NIC 2/3 e CCE. O GRÁFICO 1 ilustra a quantificação da carga viral do HPV16 e do HPV18.

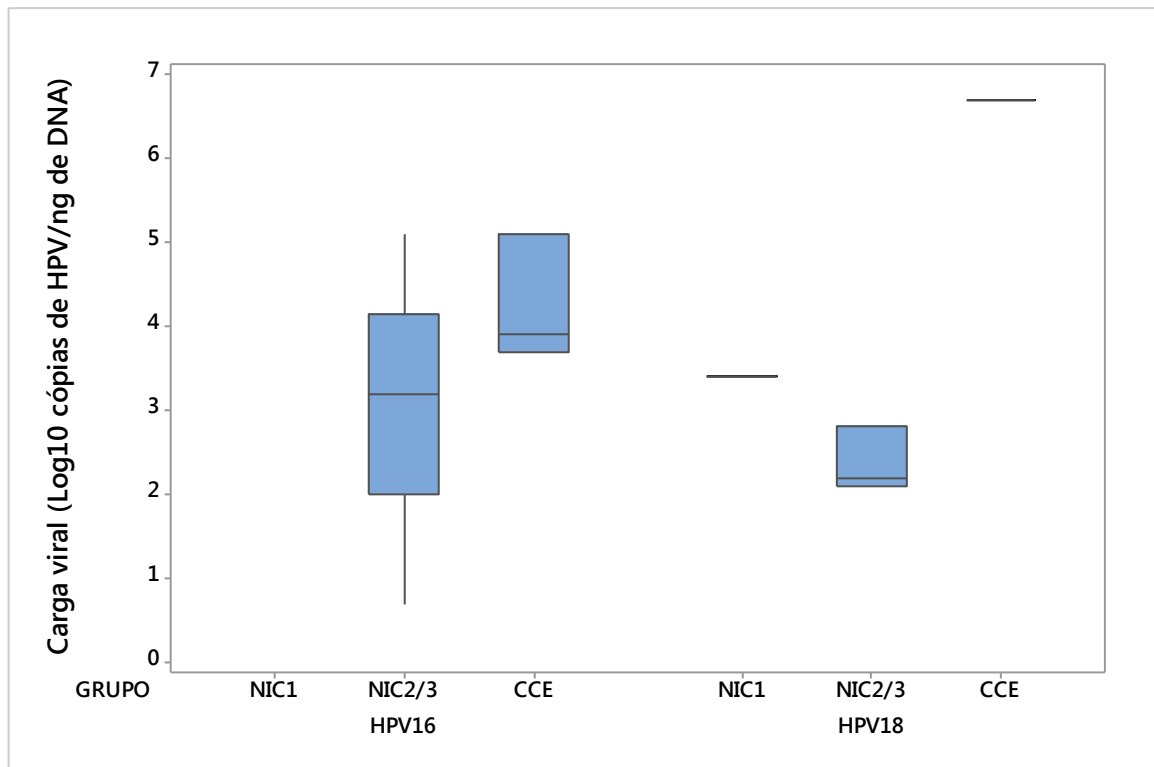


GRÁFICO 1 - Gráfico do tipo *boxplot* da quantificação da carga viral do HPV16 e do HPV18 em amostras dos grupos NIC 1, NIC 2/3 e CCE.

As análises da quantificação da expressão de mRNAs específicos para HPV16 e HPV18 em amostras de biópsia cervical de pacientes dos grupos NIC 1, NIC 2/3 e CCE demonstraram maiores médias de carga viral do HPV16 e HPV18 nos grupos NIC 2/3 e CCE, respectivamente, com valores de 2,74 e 4,96 Log₁₀ cópias de HPV/ng de DNA, nesta ordem. Quando foram utilizados mRNAs híbridos para HPV16/HPV18, as análises da quantificação da expressão demonstraram médias de carga viral de 2,70, 3,18 e 3,74 Log₁₀ cópias de HPV/ng de DNA, respectivamente. Tanto nas amplificações com iniciadores específicos, quanto híbridos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos NIC 1, NIC 2/3 e CCE. O GRÁFICO 2 ilustra os dados da quantificação da expressão gênica do HPV16 e do HPV18, encerrando a descrição dos resultados (detecção, genotipagem, carga viral e expressão gênica) diretamente relacionados ao HPV nesse estudo.

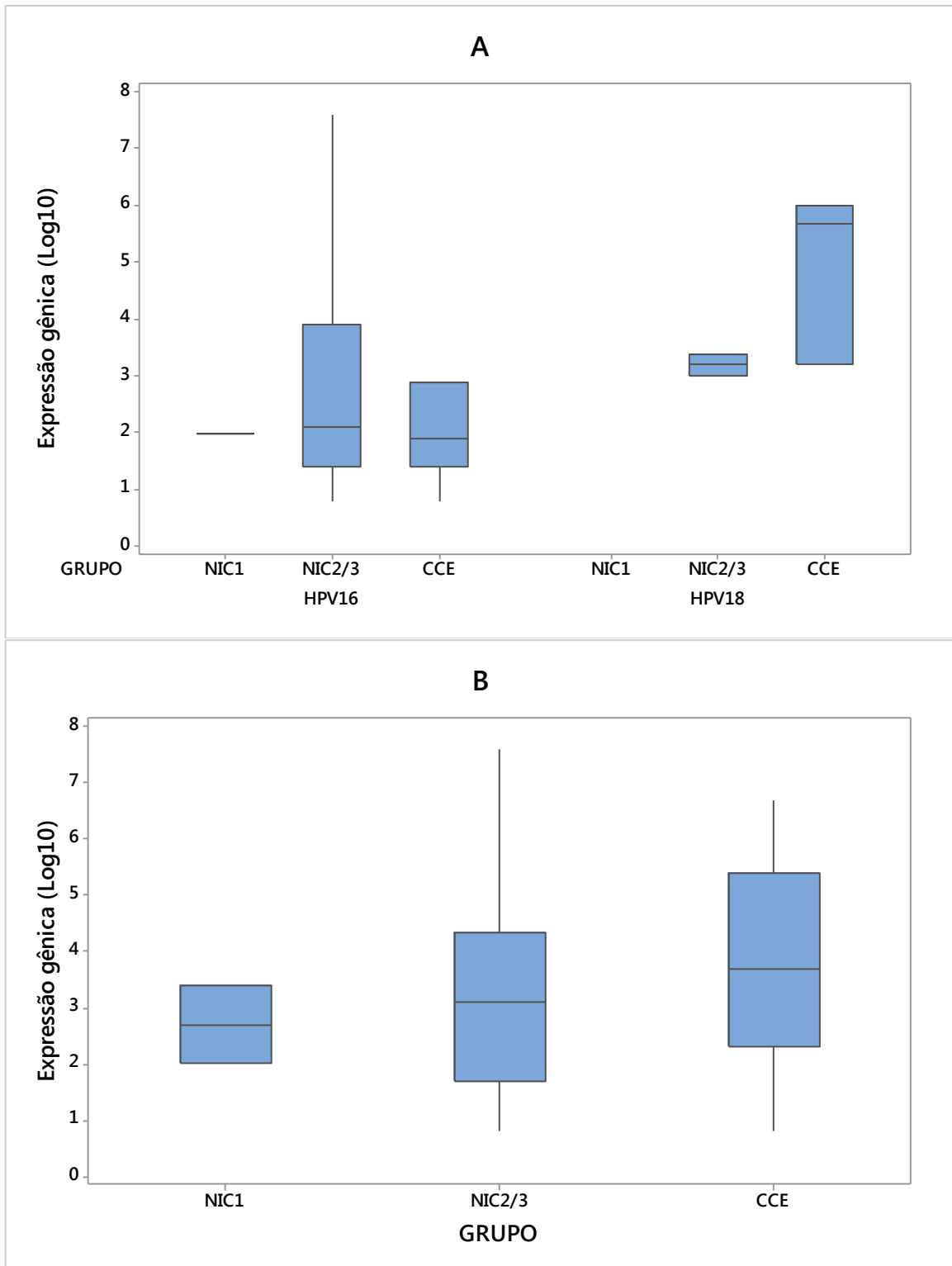


GRÁFICO 2 - Gráficos do tipo *boxplot* da quantificação da expressão do mRNA do HPV16 e do HPV18 em amostras grupos NIC 1, NIC 2/3 e CCE. A) Expressão gênica com iniciadores específicos; B) Expressão gênica com iniciadores híbridos.

4.4 – Imuno-histoquímica

4.4.1 – Descrição morfológica das classificações imuno-histoquímicas

Os resultados da primeira classificação imuno-histoquímica dos biomarcadores RAP1, RAP1GAP e p16, nos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3, conforme os critérios nível de imunorreatividade do percentual de células epiteliais, da distribuição das células imunorreativas no epitélio e da intensidade da imunorreação, adotados por Klaes *et al.* (2001), estão demonstrados nas TABELAS 7, 8 e 9 abaixo. Nessas tabelas, para cada resultado do nível, são apresentados os valores numéricos inteiros ou contagem para cada grupo, com seus respectivos percentuais no próprio nível (linha) e no próprio grupo (coluna).

TABELA 7

Primeira classificação imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3

(Continua)

NÍVEL	GRUPO			
	MND	NIC 1	NIC 2/3	TOTAL
	N	N	N	N
	(% do nível) (% do grupo)	(% do nível) (% do grupo)	(% do nível) (% do grupo)	(% do nível) (% do grupo)
Percentual				
0 ou Negativo	12 (66,67) (36,36)	- - -	6 (33,33) (9,09)	18 (100,00) (9,84)
1 ou Esporádico (< 5%)	4 (26,67) (12,12)	10 (66,67) (11,90)	1 (6,67) (1,52)	15 (100,00) (8,20)
2 ou Focal (5 - 25%)	17 (18,09) (51,52)	74 (78,72) (88,10)	3 (3,19) (4,55)	94 (100,00) (51,37)
3 ou Difuso (>25%)	- - -	- - -	56 (100,00) (84,85)	56 (100,00) (30,60)
TOTAL	33 (18,03) (100,00)	84 (45,90) (100,00)	66 (36,07) (100,00)	183 (100,00) (100,00)

TABELA 7

Primeira classificação imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3

(Conclusão)

NÍVEL	GRUPO			
	MND	NIC 1	NIC 2/3	TOTAL
	N	N	N	N
	(% do nível) (% do grupo)	(% do nível) (% do grupo)	(% do nível) (% do grupo)	(% do nível) (% do grupo)
Distribuição				
0 ou Negativo	12 (66,67) (36,36)	- - -	6 (33,33) (9,09)	18 (100,00) (9,84)
1 ou Terço basal	21 (20,00) (63,64)	81 (77,14) (96,43)	3 (2,86) (4,55)	105 (100,00) (57,38)
2 ou Dois terços	- - -	3 (25,00) (3,57)	9 (75,00) (13,64)	12 (100,00) (6,56)
3 ou Três terços	- - -	- - -	48 (100,00) (72,73)	48 (100,00) (26,23)
TOTAL	33 (18,03) (100,00)	84 (45,90) (100,00)	66 (36,07) (100,00)	183 (100,00) (100,00)
Intensidade				
0 ou Negativo	12 (66,67) (36,36)	- - -	6 (33,33) (9,09)	18 (100,00) (9,84)
1 ou Fraco	14 (20,90) (42,42)	37 (55,22) (44,05)	16 (23,88) (24,24)	67 (100,00) (36,61)
2 ou Médio	7 (8,05) (21,21)	47 (54,02) (55,95)	33 (37,93) (50,00)	87 (100,00) (47,54)
3 ou Forte	- - -	- - -	11 (100,00) (16,67)	11 (100,00) (6,01)
TOTAL	33 (18,03) (100,00)	84 (45,90) (100,00)	66 (36,07) (100,00)	183 (100,00) (100,00)

Conforme a TABELA 7 acima, nas reações positivas do grupo MND, houve um predomínio do percentual “Focal (5 e 25%)” de células imunorreativas, distribuídas no terço basal do epitélio e com fraca intensidade da reação. No grupo NIC 1, 88,10% das amostras apresentaram imunorreatividade “Focal (5 e 25%)”, com distribuição predominante no terço basal do epitélio e prevalência da média intensidade da reação em 55,95% dos casos. Já no grupo NIC 2/3, houve absoluta predominância do percentual “Difuso (>25%)” de células imunorreativas, distribuídas em toda a espessura do epitélio e com média intensidade da reação. Nos critérios “Percentual” e “Intensidade”, houve diferenças estatisticamente significativas somente entre o grupo MND e os grupos NIC 1 e NIC 2/3. No critério “Distribuição” ocorreram diferenças estatisticamente significativas somente entre os grupos MND e NIC 1 e o grupo NIC 2/3.

TABELA 8

Primeira classificação imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 GAP nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3

(Continua)

NÍVEL	GRUPO			
	MND	NIC 1	NIC 2/3	TOTAL
	N	N	N	N
	(% do nível) (% do grupo)	(% do nível) (% do grupo)	(% do nível) (% do grupo)	(% do nível) (% do grupo)
Percentual				
0 ou Negativo	11 (22,92) (44,00)	20 (41,67) (32,26)	17 (35,42) (32,08)	48 (100,00) (34,29)
1 ou Esporádico (< 5%)	4 (16,67) (16,00)	19 (79,17) (30,65)	1 (4,17) (1,89)	24 (100,00) (17,14)
2 ou Focal (5 - 25%)	9 (23,68) (36,00)	23 (60,53) (37,10)	6 (15,79) (11,32)	38 (100,00) (27,14)
3 ou Difuso (>25%)	1 (3,33) (4,00)	- - -	29 (96,67) (54,72)	30 (100,00) (21,43)
TOTAL	25 (17,86) (100,00)	62 (44,29) (100,00)	53 (37,86) (100,00)	140 (100,00) (100,00)

TABELA 8

Primeira classificação imuno-histoquímica do biomarcador RAP1 GAP nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3

(Conclusão)

NÍVEL	GRUPO			
	MND	NIC 1	NIC 2/3	TOTAL
	N	N	N	N
	(% do nível) (% do grupo)	(% do nível) (% do grupo)	(% do nível) (% do grupo)	(% do nível) (% do grupo)
Distribuição				
0 ou Negativo	11 (22,92) (44,00)	20 (41,67) (32,26)	17 (35,42) (32,08)	48 (100,00) (34,29)
1 ou Terço basal	13 (22,41) (52,00)	42 (72,41) (67,74)	3 (5,17) (5,66)	58 (100,00) (41,43)
2 ou Dois terços	- - -	- - -	6 (100,00) (11,32)	6 (100,00) (4,29)
3 ou Três terços	1 (3,57) (4,00)	- - -	27 (96,43) (50,94)	28 (100,00) (20,00)
TOTAL	25 (17,86) (100,00)	62 (44,29) (100,00)	53 (37,86) (100,00)	140 (100,00) (100,00)
Intensidade				
0 ou Negativo	11 (22,92) (44,00)	20 (41,67) (32,26)	17 (35,42) (32,08)	48 (100,00) (34,29)
1 ou Fraco	13 (18,84) (52,00)	38 (55,07) (61,29)	18 (26,09) (33,96)	69 (100,00) (49,29)
2 ou Médio	1 (4,76) (4,00)	4 (19,05) (6,45)	16 (76,19) (30,19)	21 (100,00) (15,00)
3 ou Forte	- - -	- - -	2 (100,00) (3,77)	2 (100,00) (1,43)
TOTAL	25 (17,86) (100,00)	62 (44,29) (100,00)	53 (37,86) (100,00)	140 (100,00) (100,00)

Conforme apresentado na TABELA 8 acima, nas reações positivas do biomarcador RAP1 GAP no grupo MND, similarmente às reações de RAP1 (TABELA 7), houve predomínio do percentual “Focal (5 e 25%)” de células imunorreativas, distribuídas no terço basal do epitélio e com fraca intensidade da reação. No grupo NIC 1, 37,10% das amostras apresentaram imunorreatividade “Focal (5 e 25%)” e distribuição predominante no terço basal do epitélio, mas, diferentemente de RAP1, prevalência da fraca intensidade em 61,29% dos casos. No grupo NIC 2/3, houve predominância do percentual “Difuso (>25%)” de células imunorreativas e distribuição em toda a espessura do epitélio. Mas, também diferentemente de RAP1, predominou a fraca intensidade da reação. Em todos os critérios, existiram diferenças estatisticamente significativas somente entre os grupos MND e NIC 1 e o grupo NIC 2/3.

TABELA 9

Primeira classificação imuno-histoquímica do biomarcador p16 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3

(Continua)

NÍVEL	GRUPO			
	MND	NIC 1	NIC 2/3	TOTAL
	N	N	N	N
	(% do nível) (% do grupo)	(% do nível) (% do grupo)	(% do nível) (% do grupo)	(% do nível) (% do grupo)
Percentual				
0 ou Negativo	10 (71,43) (31,25)	3 (21,43) (3,57)	1 (7,14) (1,52)	14 (100,00) (7,69)
1 ou Esporádico (< 5%)	6 (54,55) (18,75)	5 (45,45) (5,95)	- - -	11 (100,00) (6,04)
2 ou Focal (5 - 25%)	16 (17,58) (50,00)	74 (81,32) (88,10)	1 (1,10) (1,52)	91 (100,00) (50,00)
3 ou Difuso (>25%)	- - -	2 (3,03) (2,38)	64 (96,67) (96,97)	66 (100,00) (36,26)
TOTAL	32 (17,58) (100,00)	84 (46,15) (100,00)	66 (36,26) (100,00)	182 (100,00) (100,00)

TABELA 9

Primeira classificação imuno-histoquímica do biomarcador p16 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3

(Conclusão)

NÍVEL	GRUPO			
	MND	NIC 1	NIC 2/3	TOTAL
	N	N	N	N
	(% do nível) (% do grupo)	(% do nível) (% do grupo)	(% do nível) (% do grupo)	(% do nível) (% do grupo)
Distribuição				
0 ou Negativo	10 (71,43) (31,25)	3 (21,43) (3,57)	1 (7,14) (1,52)	14 (100,00) (7,69)
1 ou Terço basal	21 (22,11) (65,63)	73 (76,84) (86,90)	1 (1,05) (1,52)	95 (100,00) (52,20)
2 ou Dois terços	1 (6,25) (3,13)	6 (37,50) (7,14)	9 (56,25) (13,64)	16 (100,00) (8,79)
3 ou Três terços	- - -	2 (3,51) (2,38)	55 (96,49) (83,33)	57 (100,00) (31,32)
TOTAL	32 (17,58) (100,00)	84 (46,15) (100,00)	66 (36,26) (100,00)	182 (100,00) (100,00)
Intensidade				
0 ou Negativo	10 (71,43) (31,25)	3 (21,43) (3,57)	1 (7,14) (1,52)	14 (100,00) (7,69)
1 ou Fraco	13 (28,26) (40,63)	31 (67,39) (36,90)	2 (4,35) (3,03)	46 (100,00) (25,27)
2 ou Médio	8 (17,02) (25,00)	36 (76,60) (42,86)	3 (6,38) (4,55)	47 (100,00) (25,82)
3 ou Forte	1 (1,33) (3,13)	14 (18,67) (16,67)	60 (80,00) (90,91)	75 (100,00) (41,21)
TOTAL	32 (17,58) (100,00)	84 (46,15) (100,00)	66 (36,26) (100,00)	182 (100,00) (100,00)

De acordo com a TABELA 9 acima, o biomarcador p16 apresentou, nas reações positivas do grupo MND, também similarmente às reações de RAP1, predomínio do percentual “Focal (5 e 25%)” de células imunorreativas, distribuídas no terço basal do epitélio e com fraca intensidade da reação. No grupo NIC 1, 88,10% das amostras apresentaram imunorreatividade “Focal (5 e 25%)”, distribuição predominante no terço basal do epitélio e, similarmente ao biomarcador RAP1, maioria de média intensidade em 42,86% dos casos. No grupo NIC 2/3, observaram-se predominâncias absolutas, equivalentes aos percentuais de 96,97%, 83,33% e 90,91% dos casos, dos maiores critérios do percentual, distribuição e intensidade, respectivamente “Difuso (>25%)”, “Três terços” e “Forte”. Exceto pela diferença não significativa entre as distribuições dos grupos MND e NIC 1, todas as outras comparações entre as proporções dos resultados dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3 apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Para todos os biomarcadores, RAP1, RAP1 GAP e p16 foi possível estabelecer uma associação da presença do DNA do HPV com os níveis de imunorreatividade observados na primeira classificação imuno-histoquímica nos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3, para todos os critérios, mas particularmente para a intensidade das reações. No caso da expressão do biomarcador RAP1 no grupo NIC 2/3, a maioria dos 43 casos positivos para o DNA do HPV apresentaram intensidade “Forte” (16,28%) e “Médio” (53,49%). No grupo NIC 1, dos 34 casos positivos, 18 (52,94%) apresentaram nível “Médio” de intensidade da reação. No grupo MND, os 15 casos positivos para o DNA do HPV foram distribuídos da seguinte forma: 7 casos (46,67%) apresentaram nível de intensidade “Negativo”, 5 (33,33%) nível “Fraco” e 3 (20%) nível “Médio”. Os mesmos achados, com percentuais muito próximos, foram encontrados para o biomarcador RAP1GAP. Entretanto, para o biomarcador p16, nos critérios do grupo NIC 2/3, essa associação foi fortemente consolidada porque a ampla maioria das proporções dos critérios percentual, distribuição e intensidade do grupo NIC 2/3 apresentou resultado positivo para a presença do DNA do HPV. Em termos percentuais, 65,62%, 63,63% e 66,67% das amostras classificadas pelos critérios de percentual “Difuso (>25%)”, distribuição “Três terços” e intensidade “Forte”, respectivamente, foram positivas para o HPV, com diferenças estatisticamente significativas para as amostras negativas. Para o biomarcador p16 nos grupos NIC 1 e MND, a maioria dos casos positivos para o DNA do HPV apresentou nível “Fraco” de intensidade.

Para finalidade estatística de comparação de todos esses critérios de imunorreatividade observados na primeira classificação imuno-histoquímica dos biomarcadores, RAP1, RAP1 GAP e p16 nos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3, esses mesmos critérios foram categorizados em proporções dos níveis basal e elevado, equivalentes às somas dos níveis “0 (Zero)” e “1 (Um)”, para basal, e “2 (Dois)” e “3 (Três)”, para elevado. Após a categorização dos resultados da primeira classificação imuno-histoquímica, essas proporções foram comparadas entre os próprios grupos e entre os próprios biomarcadores.

No grupo MND, as únicas diferenças estatisticamente significativas observadas no Teste exato de Fisher para comparação de duas proporções, com valor $P < 0,05$, nessa primeira classificação, foram entre as intensidades dos biomarcadores RAP1 e p16 e a intensidade de RAP1 GAP. Ou seja, no grupo MND, os biomarcadores RAP1, RAP1 GAP e p16 apresentam equivalência dos critérios de percentual e distribuição celulares de imunorreatividade e de intensidade das reações imuno-histoquímicas.

No grupo NIC 1, ainda na primeira classificação, observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o percentual, a distribuição e a intensidade de RAP1 GAP e os equivalentes critérios de RAP1 e p16. Não foram observadas, no grupo NIC 1, diferenças significativas entre os biomarcadores RAP1 e p16.

No grupo NIC 2/3, finalizando essa primeira classificação, além das diferenças estatisticamente significativas observadas entre o percentual, a distribuição e a intensidade de RAP1 GAP e os equivalentes critérios de RAP1 e p16, foram observadas diferenças estatisticamente significativas apenas entre a intensidade dos biomarcadores RAP1 e p16. Ou seja, RAP 1 e p16 apresentaram equivalências no percentual e na distribuição da imunorreatividade celular no epitélio escamoso.

Após essa descrição detalhada dos resultados da primeira classificação imuno-histoquímica, os resultados da segunda classificação imuno-histoquímica, conforme os critérios descritos por Galgano *et al.* (2010) do nível de imunorreatividade dos biomarcadores RAP1, RAP1 GAP, p16 e Ki67, nos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3, estão demonstrados na TABELA 10 abaixo:

TABELA 10

Segunda classificação imuno-histoquímica dos biomarcadores RAP1, RAP GAP, p16 e Ki67 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3

(Continua)

NÍVEL	GRUPO			
	MND	NIC 1	NIC 2/3	TOTAL
	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)
RAP1				
0	12 (66,67) (36,36)	- - -	6 (33,33) (9,09)	18 (100,00) (9,84)
1	14 (22,95) (42,42)	43 (70,49) (51,19)	4 (6,56) (6,06)	61 (100,00) (33,33)
2	7 (14,29) (21,21)	41 (83,67) (48,81)	1 (2,04) (1,52)	49 (100,00) (26,78)
3	- - -	- - -	55 (100,00) (83,33)	55 (100,00) (30,05)
TOTAL	33 (18,03) (100,00)	84 (45,90) (100,00)	66 (36,07) (100,00)	183 (100,00) (100,00)
RAP1 GAP				
0	11 (22,92) (44,00)	20 (41,67) (32,26)	17 (35,42) (32,08)	48 (100,00) (34,29)
1	12 (24,49) (48,00)	34 (69,39) (54,84)	3 (6,12) (5,66)	49 (100,00) (35,00)
2	1 (7,69) (4,00)	8 (61,54) (12,90)	4 (30,77) (7,55)	13 (100,00) (9,29)
3	1 (3,33) (4,00)	- - -	29 (96,67) (54,72)	30 (100,00) (21,43)
TOTAL	25 (17,86) (100,00)	62 (44,29) (100,00)	53 (37,86) (100,00)	140 (100,00) (100,00)

TABELA 10

Segunda classificação imuno-histoquímica dos biomarcadores RAP1, RAP GAP, p16 e Ki67 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3

(Conclusão)

NÍVEL	GRUPO			
	MND	NIC 1	NIC 2/3	TOTAL
	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)
p16				
0	10 (71,43) (31,25)	3 (21,43) (3,57)	1 (7,14) (1,52)	14 (100,00) (7,69)
1	14 (29,17) (43,75)	32 (66,67) (38,10)	2 (4,17) (3,03)	48 (100,00) (26,37)
2	8 (14,55) (25,00)	47 (85,45) (55,95)	- - -	55 (100,00) (30,22)
3	- - -	2 (3,08) (2,38)	63 (96,92) (95,45)	65 (100,00) (35,71)
TOTAL	32 (17,58) (100,00)	84 (46,15) (100,00)	66 (36,26) (100,00)	182 (100,00) (100,00)
Ki67				
0	11 (57,89) (44,00)	5 (26,32) (8,06)	3 (15,79) (6,00)	19 (100,00) (13,87)
1	14 (23,73) (56,00)	44 (74,58) (70,97)	1 (1,69) (2,00)	59 (100,00) (43,07)
2	- - -	13 (65,00) (20,97)	7 (35,00) (14,00)	20 (100,00) (14,60)
3	- - -	- - -	39 (100,00) (78,00)	39 (100,00) (28,47)
TOTAL	25 (18,25) (100,00)	62 (45,26) (100,00)	50 (36,50) (100,00)	137 (100,00) (100,00)

Conforme a TABELA 10 acima, nas reações positivas do biomarcador RAP1 no grupo MND, houve um predomínio do nível “1”, equivalente a 42,42% das amostras. No grupo NIC 1, pouco mais da metade (51,19%) das amostras positivas para RAP1 foram classificadas no nível “1”. A outra parte, correspondente a 48,81%, foi classificada no nível “2”. Já no grupo NIC 2/3, a maioria absoluta das amostras positivas para RAP1, equivalente a 83,33%, foi classificada no nível “3”. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as proporções de todos os grupos de diagnóstico histopatológico. No grupo NIC 2/3, também foi observada associação entre a detecção positiva para o HPV e o nível “3” de imunorreatividade.

Nas reações positivas do biomarcador RAP1 GAP no grupo MND, similarmente às reações de RAP1 (TABELA 7), houve um predomínio do nível “1”, equivalente a 48% das amostras. No grupo NIC 1, a maioria (54,84%) das amostras positivas para RAP1 GAP também foram classificadas no nível “1”. No grupo NIC 2/3, a maioria das amostras positivas para RAP1 GAP, equivalente a 54,72%, foi classificada no nível “3”. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas somente entre as proporções dos grupos MND e NIC 1 e o grupo NIC 2/3.

De acordo com a TABELA 10 acima, o biomarcador p16 apresentou, nas reações positivas do grupo MND, similarmente às reações de RAP1, predomínio do nível “1”. No grupo NIC 1, também similarmente ao biomarcador RAP1, a maioria ou 55,95% das amostras apresentaram nível “2” de imunorreatividade. No grupo NIC 2/3, praticamente a totalidade ou impressionantes 95,45% das amostras positivas para p16 foram classificadas no nível “3” de imunorreatividade. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as proporções de todos os grupos de diagnóstico histopatológico e, no grupo NIC 2/3, também foi observada associação entre a detecção positiva para o HPV e o nível “3” de imunorreatividade. Os resultados da análise imuno-histoquímica do biomarcador Ki67, disponíveis somente nessa segunda classificação, exceto pela grande predominância (70,97%) do nível “1” no grupo NIC 1, demonstraram grande similaridade com os resultados dos biomarcadores RAP1 e p16 nos grupos MND e NIC 2/3.

Em seguida, para melhor visualização dos resultados dessa segunda classificação imuno-histoquímica, os níveis de imunorreatividade dos biomarcadores RAP1, RAP1 GAP, p16 e Ki67 foram categorizados nos níveis basal (soma dos níveis “0” e “1”) e elevado (soma dos níveis “2” e “3”) e suas proporções comparadas (TABELA 11).

TABELA 11

Categorização da segunda classificação imuno-histoquímica dos biomarcadores RAP1, RAP GAP, p16 e Ki67 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3

NÍVEL	GRUPO			
	MND	NIC 1	NIC 2/3	TOTAL
	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)	N (% do nível) (% do grupo)
RAP1				
Basal	26 (32,91) (78,79)	43 (54,43) (51,19)	10 (12,66) (15,15)	79 (100,00) (43,17)
Elevado	7 (6,73) (21,21)	41 (39,42) (48,81)	56 (53,85) (84,85)	104 (100,00) (100,00)
TOTAL	33 (18,03) (100,00)	84 (45,90) (100,00)	66 (36,07) (100,00)	183 (100,00) (100,00)
RAP1 GAP				
Basal	25 (25,25) (92,59)	54 (54,55) (87,10)	20 (20,20) (37,74)	99 (100,00) (69,72)
Elevado	2 (4,65) (7,41)	8 (18,60) (12,90)	33 (76,74) (62,26)	43 (100,00) (30,28)
TOTAL	27 (19,01) (100,00)	62 (43,66) (100,00)	53 (37,32) (100,00)	142 (100,00) (100,00)
p16				
Basal	22 (36,67) (73,33)	35 (58,33) (41,67)	3 (5,00) (4,55)	60 (100,00) (33,33)
Elevado	8 (6,67) (26,67)	49 (40,83) (58,33)	63 (52,50) (95,45)	120 (100,00) (66,67)
TOTAL	30 (16,67) (100,00)	84 (46,67) (100,00)	66 (36,67) (100,00)	180 (100,00) (100,00)
Ki67				
Basal	27 (33,75) (100,00)	49 (61,25) (79,03)	4 (5,00) (8,00)	80 (100,00) (57,55)
Elevado	- - -	13 (22,03) (20,97)	46 (77,97) (92,00)	59 (100,00) (42,45)
TOTAL	27 (19,42) (100,00)	62 (44,60) (100,00)	50 (35,97) (100,00)	139 (100,00) (100,00)

Após a categorização dos níveis de imunorreatividade dos biomarcadores RAP1, RAP1 GAP, p16 e Ki67 dessa segunda classificação imuno-histoquímica, as proporções dos níveis basal e elevado foram comparadas entre os grupos dos próprios biomarcadores e entre os diferentes biomarcadores. O Teste exato de Fisher foi utilizado para comparação das diferentes proporções.

Os biomarcadores RAP1, p16 e Ki67 apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em todas as comparações das proporções entre os grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3. O biomarcador RAP1 GAP não apresentou diferenças entre os grupos MND e NIC 1.

No grupo MND, as únicas diferenças estatisticamente significativas observadas no Teste exato de Fisher para comparação de duas proporções, com valor $p < 0,05$, nessa segunda classificação, foram entre os níveis de RAP1 e p16 e o nível de Ki67. Ou seja, no grupo MND, os biomarcadores RAP1 e p16 apresentam equivalência dos níveis de imunorreatividade nessa segunda classificação imuno-histoquímica.

No grupo NIC 1, observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de imunorreatividade de RAP1 e p16 quando comparados aos níveis de RAP1 GAP e Ki67. Entretanto, não foram observadas diferenças entre RAP1 e p16 e entre RAP1 GAP e Ki67.

No grupo NIC 2/3, finalizando os resultados dessa segunda classificação, somente foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o biomarcador RAP1 GAP e os outros biomarcadores. Ou seja, RAP 1, p16 e Ki67 apresentaram equivalências nos níveis de imunorreatividade celular no epitélio escamoso.

A representação gráfica a seguir dos dados da TABELA 11 permite, mais claramente, a visualização da equivalência preponderante entre os níveis de expressão dos biomarcadores estudados, nessa segunda classificação imuno-histoquímica, após a categorização dos resultados em níveis basal e elevado (GRAFICO 3).

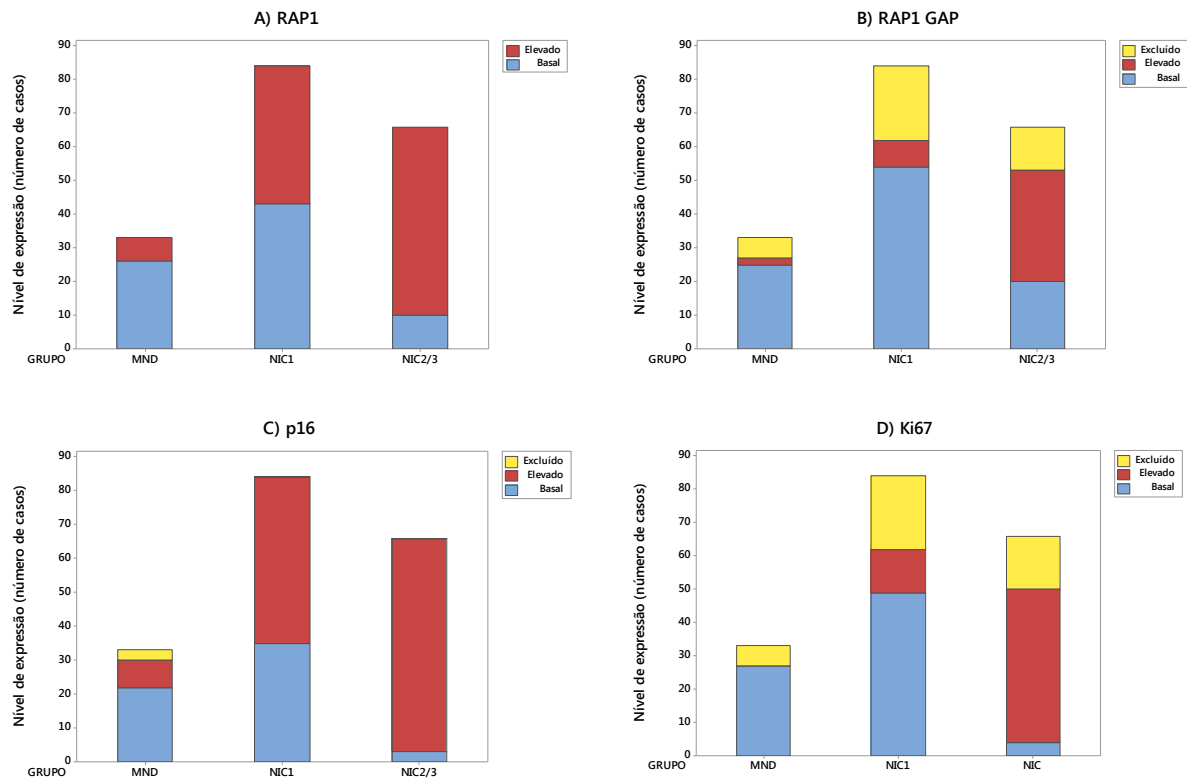


GRÁFICO 3 – Níveis categorizados de expressão dos biomarcadores RAP1, RAP1 GAP, p16 e Ki67 na segunda classificação imuno-histoquímica. A) RAP1; B) RAP1 GAP; C) p16; e D) Ki67.

Como se pode observar no GRÁFICO 3, exceto pelo nível elevado da expressão do biomarcador Ki67, que se apresentou exclusivamente elevado nos grupos NIC 1 e NIC 2/3, os biomarcadores RAP1, RAP1 GAP e p16 apresentaram padrões relativamente similares de expressão imunofenotípica. Ou seja, esses biomarcadores exibiram percentuais aproximados de níveis basal e elevado nos três grupos de diagnóstico histopatológica. Mais detalhadamente, os biomarcadores RAP1 e p16 se assemelham muito no nível basal e p16 e Ki67 no nível elevado.

Retomando agora, nessa segunda classificação imuno-histoquímica, após a categorização dos dados, aquela questão da associação entre a expressão imunofenotípica dos biomarcadores, RAP1, RAP1 GAP, p16 e Ki67, nos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3, e a presença do DNA do HPV nas amostras, foram evidenciadas, nova e progressivamente, maiores proporções de casos positivos para o HPV do grupo MND ao grupo NIC 2/3.

O GRÁFICO 4 abaixo ilustra, claramente, essa associação entre a presença do HPV e imunofenótipo dos biomarcadores RAP1, RAP1 GAP, p16 e Ki67 nos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3:

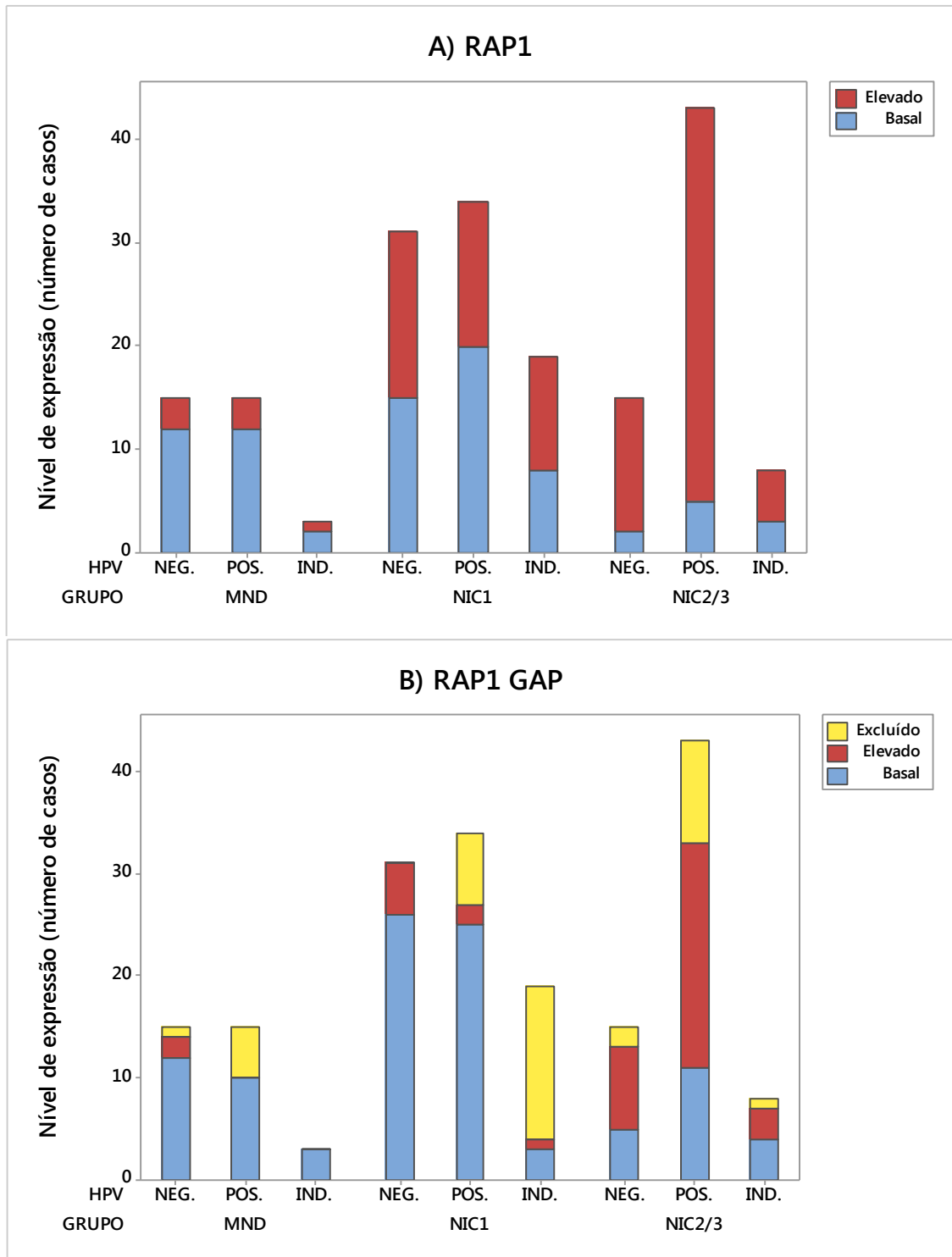


GRÁFICO 4 - Associação entre a presença do HPV e o imunofenótipo dos biomarcadores RAP1, RAP1 GAP, p16 e Ki67 nos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3. A) RAP1; B) RAP1 GAP (Continua).

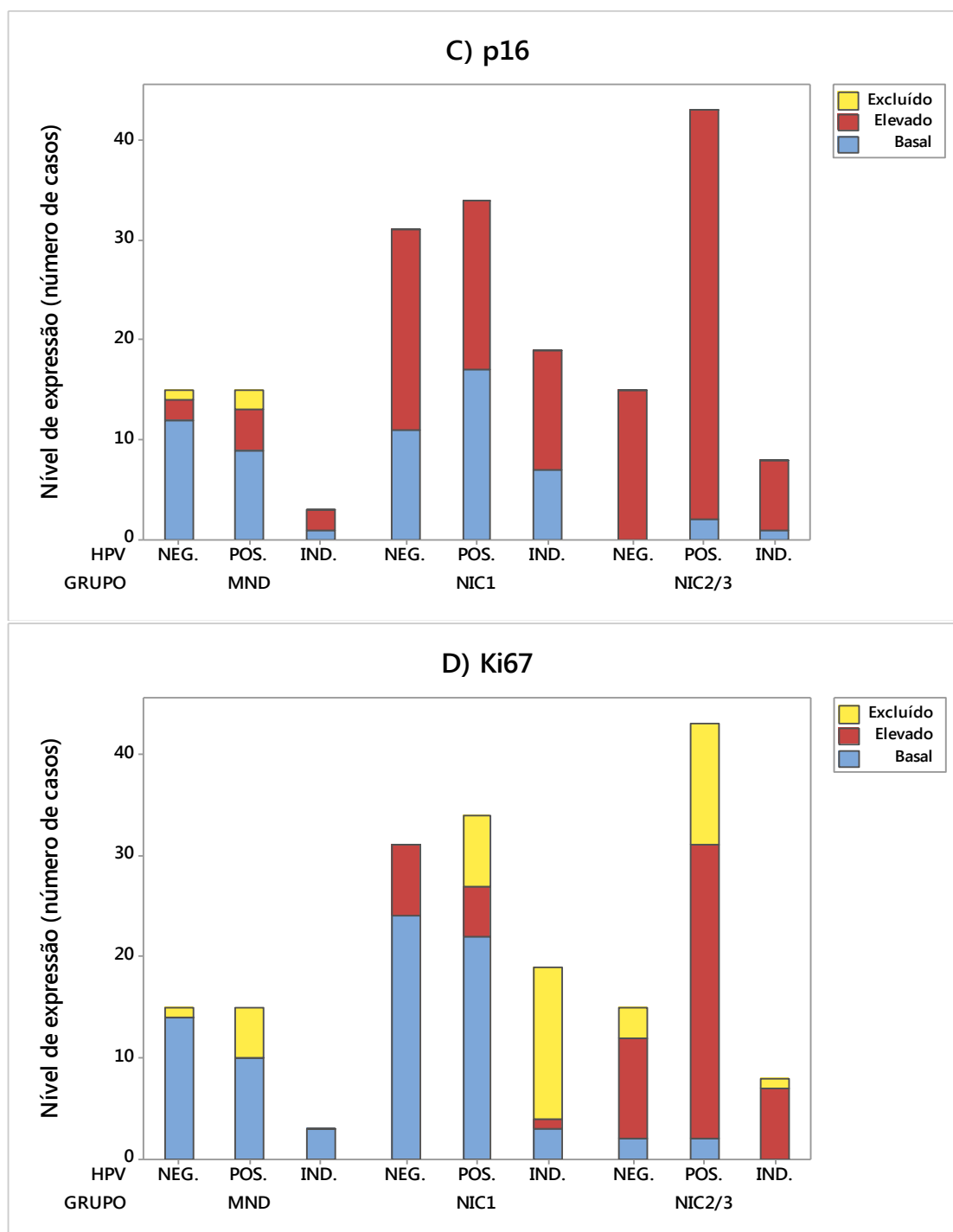


GRÁFICO 4 - Associação entre a presença do HPV e o imunofenótipo dos biomarcadores RAP1, RAP1 GAP, p16 e Ki67 nos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3. C) p16; D) Ki67 (Conclusão).

Morfologicamente, todos esses resultados das classificações imunohistoquímicas dos biomarcadores RAP1, RAP1 GAP e p16, nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3, podem ser observados, em detalhe, nos painéis das FIGURAS 18 a 20.

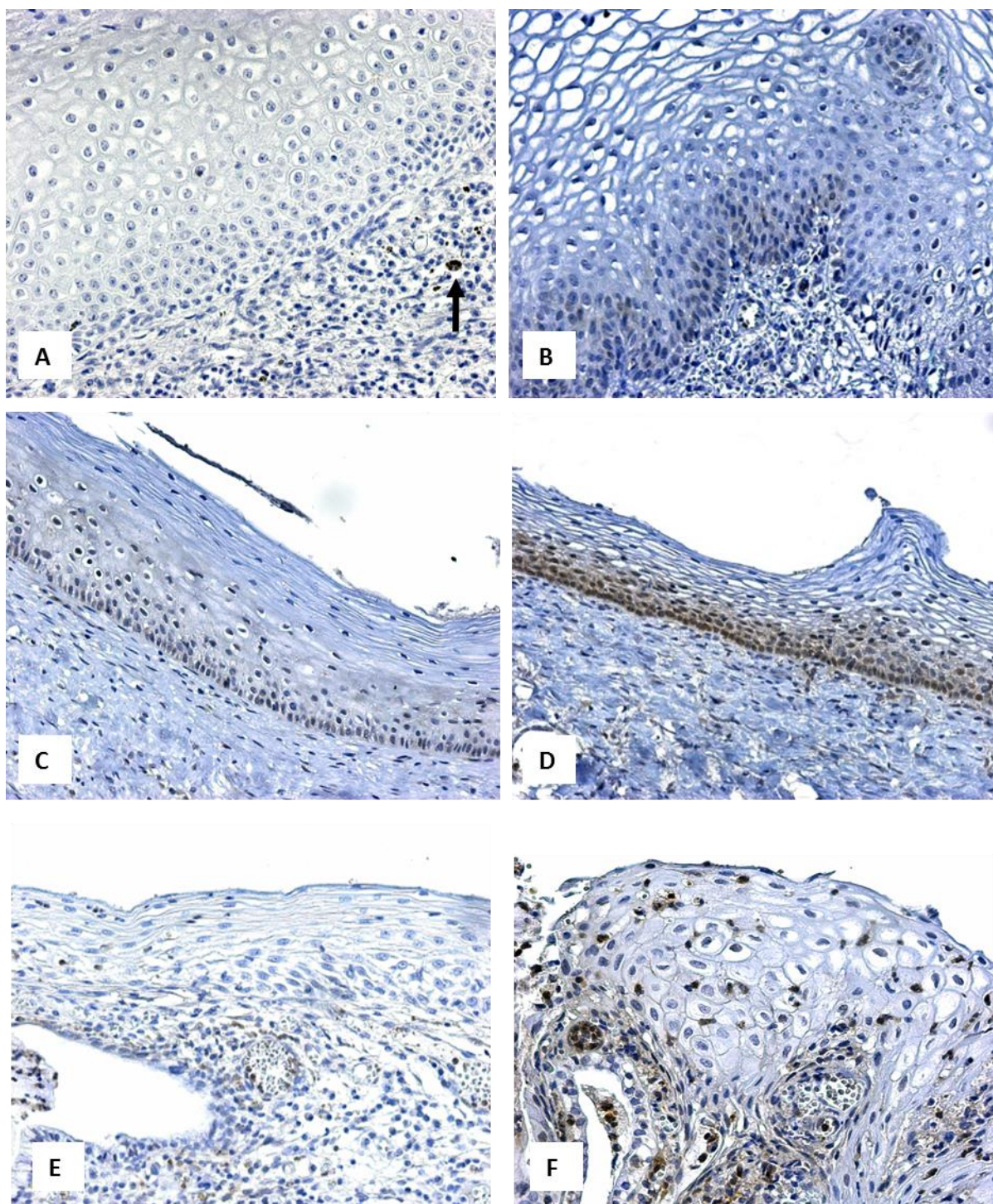


FIGURA 18 - Imuno-histoquímica de RAP1 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3. A) Mucosa escamosa do colo uterino sem evidência de reatividade. O controle positivo interno da reação pode ser observado pela reatividade de células inflamatórias no estroma da mucosa (seta). B) Mucosa escamosa com o percentual inferior a 5% das células epiteliais reativas no terço basal e com média intensidade da reação. C) Mucosa escamosa com o percentual entre 5 a 25% das células epiteliais reativas no terço basal e com fraca intensidade da reação. D) Mucosa escamosa com o percentual entre 5 a 25% das células epiteliais reativas no terço basal e com média intensidade da reação. E) Mucosa escamosa do colo uterino sem evidência de reatividade. F) Mucosa escamosa com o percentual inferior a 5% das células epiteliais reativas no terço basal e com fraca intensidade da reação. Observam-se também células inflamatórias intraepiteliais reativas. (Continua).

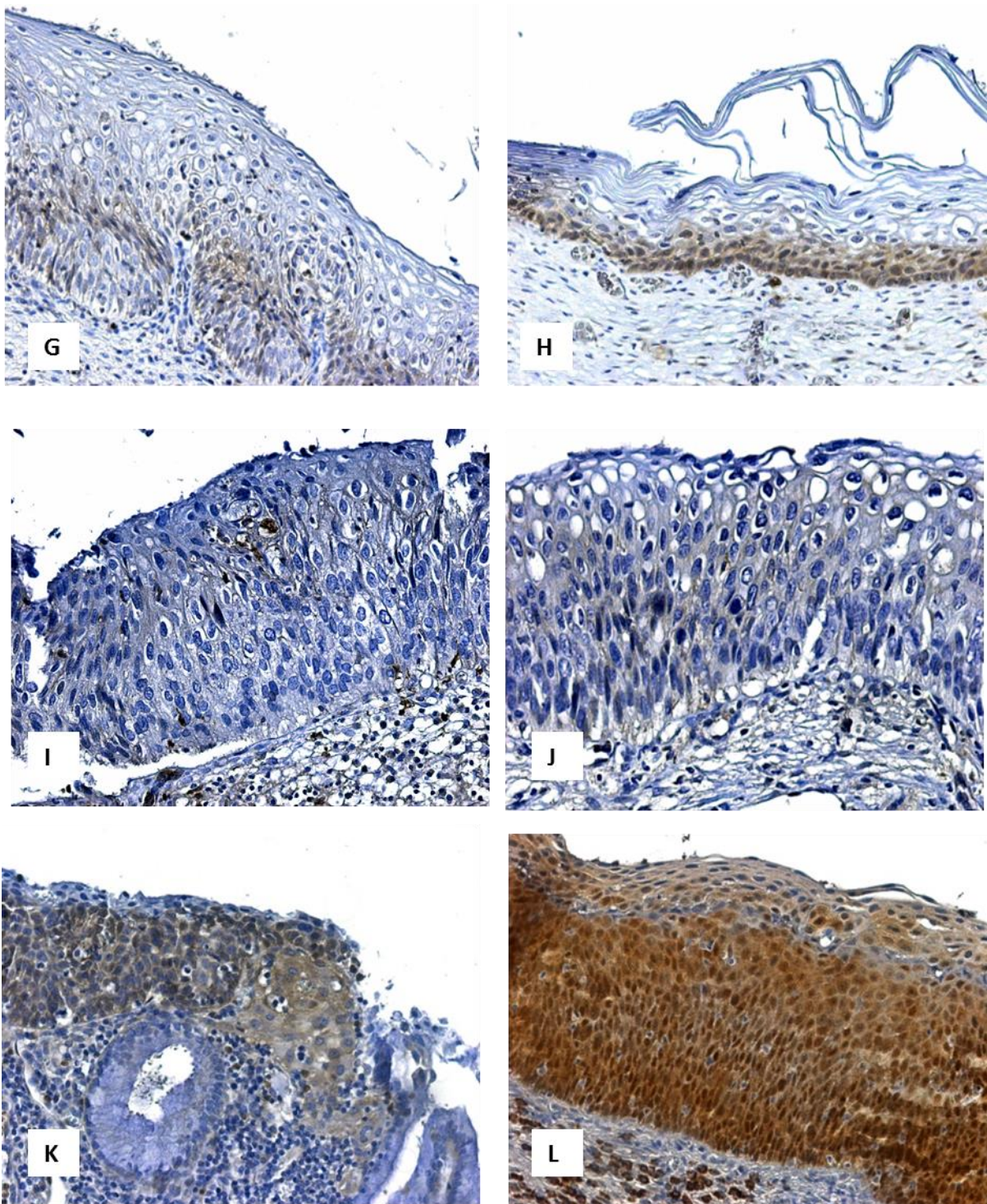


FIGURA 18 - Imuno-histoquímica de RAP1 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3. G) Mucosa escamosa com o percentual entre 5 a 25% das células epiteliais reativas no terço basal e com fraca intensidade da reação. H) Mucosa escamosa com o percentual entre 5 a 25% das células epiteliais reativas no terço basal e com média intensidade da reação. I) Mucosa escamosa do colo uterino com reatividade entre 5 e 25% do percentual das células, com fraca intensidade, ao longo de toda a espessura do epitélio. J) Mucosa escamosa com o percentual superior a 25% das células epiteliais reativas em toda a espessura do epitélio e com fraca intensidade da reação. K) Mucosa escamosa com o percentual superior a 25% das células epiteliais reativas em toda a espessura do epitélio e com média intensidade da reação. L) Mucosa escamosa com o percentual superior a 25% das células epiteliais reativas em toda a espessura do epitélio e com forte intensidade da reação. (Conclusão).

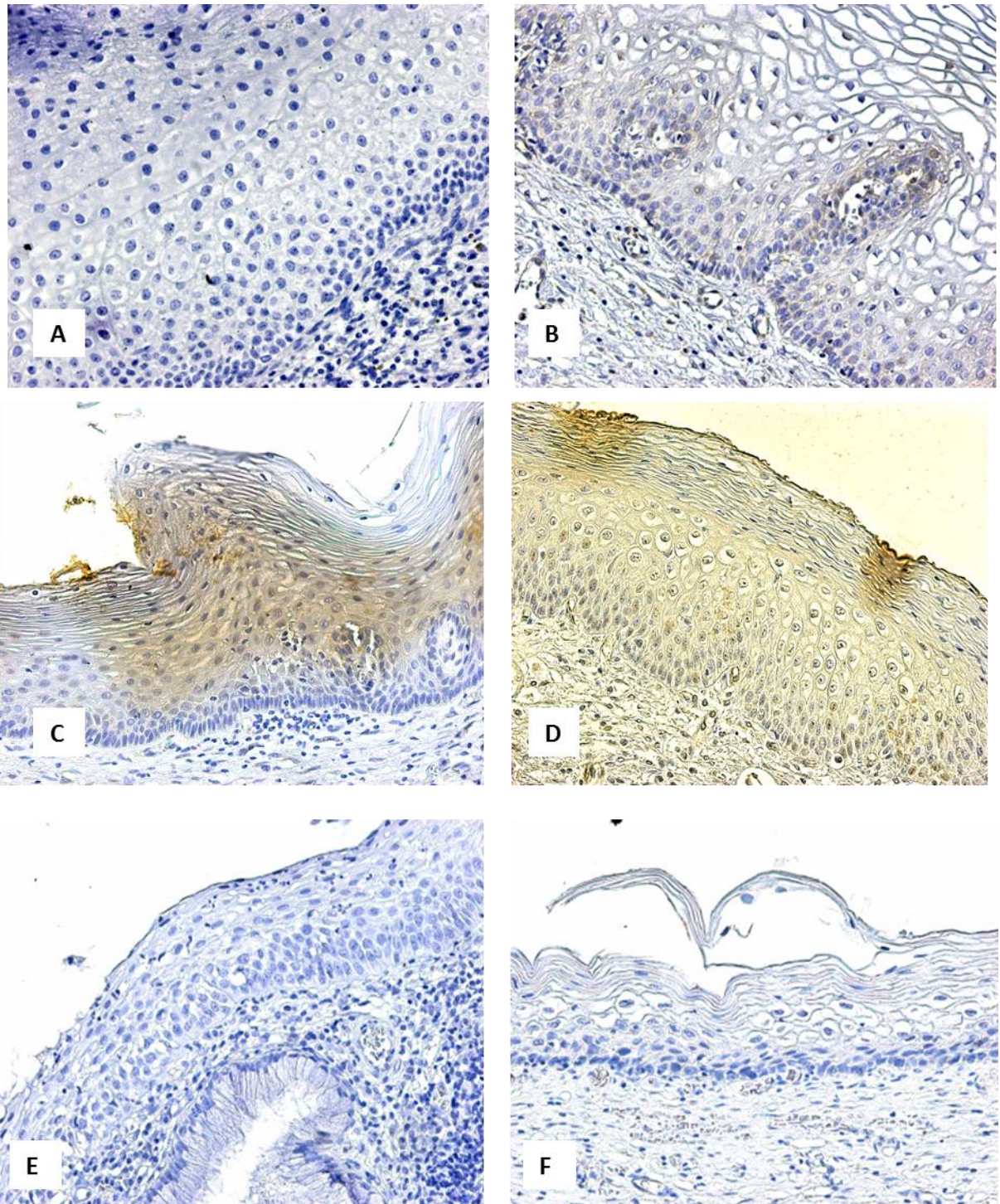


FIGURA 19 - Imuno-histoquímica de RAP1 GAP nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3. A) Mucosa escamosa do colo uterino sem evidência de reatividade. B) Mucosa escamosa com o percentual inferior a 5% das células epiteliais reativas no terço basal e com fraca intensidade da reação. C e D) Mucosa escamosa com reatividade heterogênea. E) Mucosa escamosa do colo uterino sem evidência de reatividade. F) Mucosa escamosa com percentual inferior a 5% das células epiteliais reativas no terço basal e com fraca intensidade da reação. Observam-se também células inflamatórias intraepiteliais reativas. (Continua).

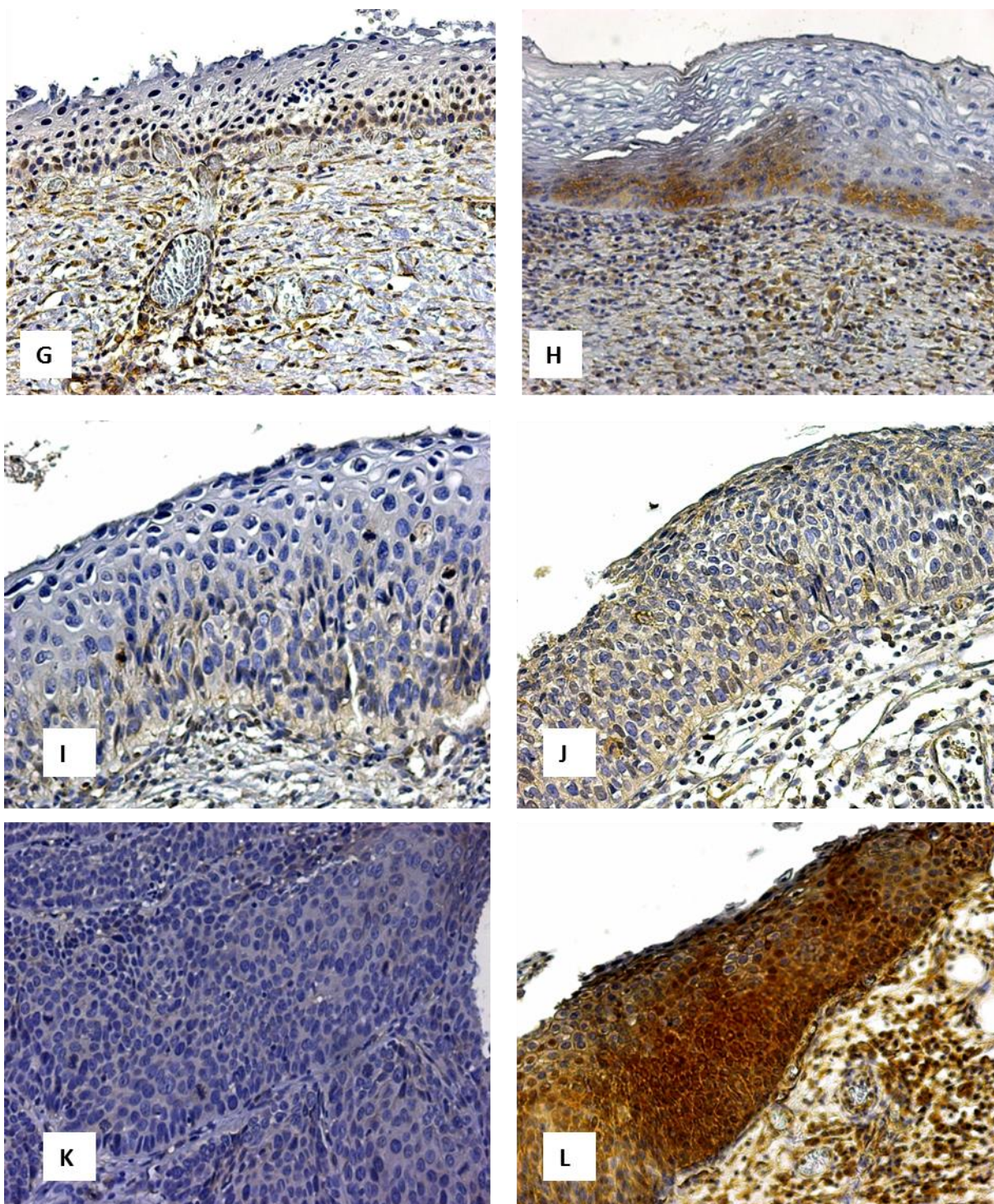


FIGURA 19 - Imuno-histoquímica de RAP1 GAP nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3. G) Mucosa escamosa com o percentual entre 5 a 25% das células epiteliais reativas no terço basal e com média intensidade da reação. H) Mucosa escamosa com células epiteliais heterogeneamente reativas no terço basal e com média intensidade da reação. I e J) Mucosa escamosa com o percentual superior a 25% das células epiteliais reativas em toda a espessura do epitélio e com média intensidade da reação. K) Mucosa escamosa com o percentual superior a 25% das células epiteliais reativas em toda a espessura do epitélio e com fraca intensidade da reação. L) Mucosa escamosa com o percentual superior a 25% das células epiteliais reativas em toda a espessura do epitélio, com forte intensidade da reação e forte reatividade das células inflamatórias do estroma (Conclusão).

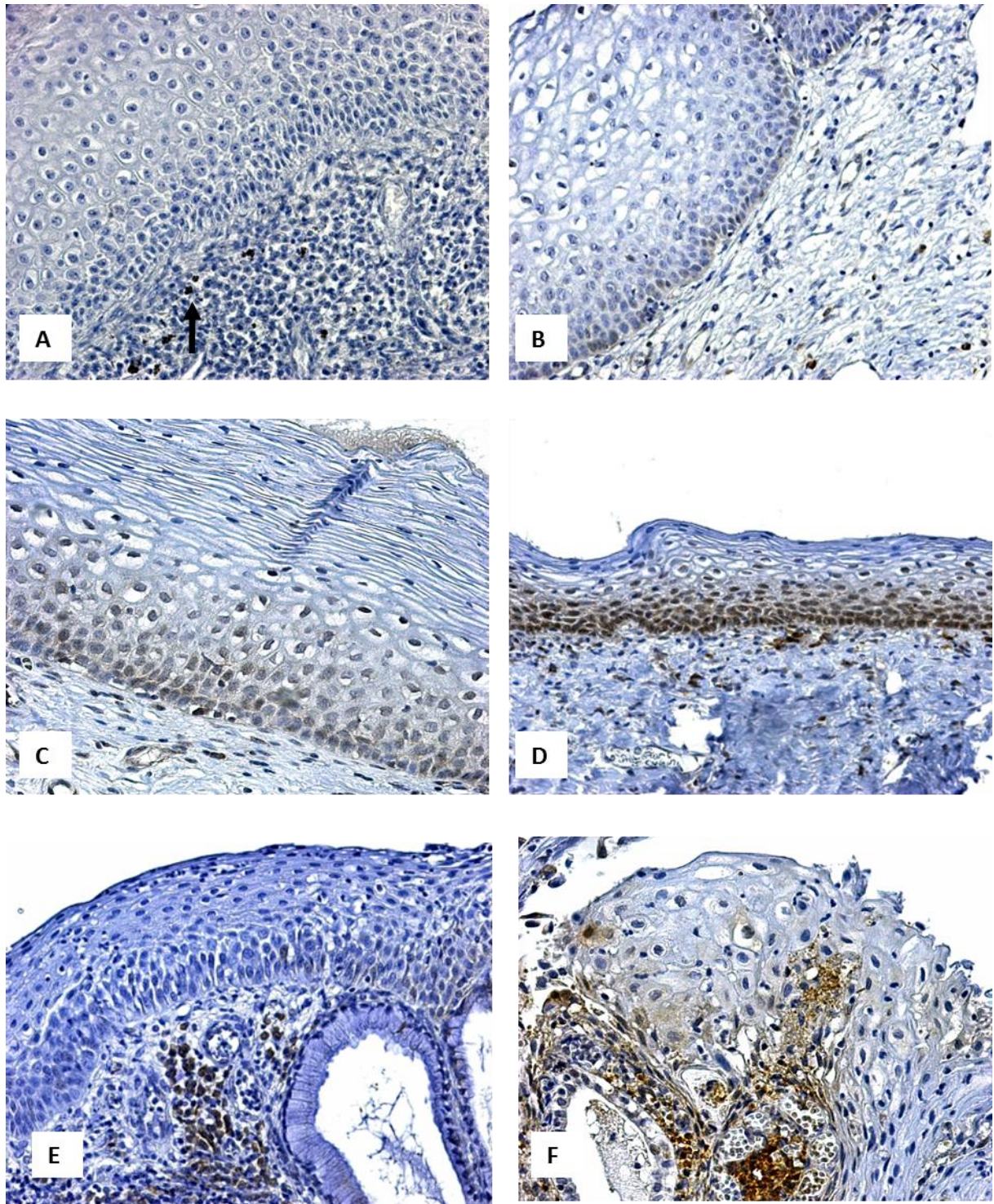


FIGURA 20 - Imuno-histoquímica de p16 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3. A) Mucosa escamosa do colo uterino sem evidência de reatividade. Seta indica o controle positivo interno da reação. B) Mucosa escamosa com o percentual inferior a 5% das células epiteliais reativas no terço basal e com fraca intensidade da reação. C) Mucosa escamosa com o percentual entre 5 a 25% das células epiteliais reativas no terço basal e com fraca intensidade da reação. D) Mucosa escamosa com o percentual entre 5 a 25% das células epiteliais reativas no terço basal e com média intensidade da reação. E) Mucosa escamosa do colo uterino sem evidência de reatividade. F) Mucosa escamosa com o percentual inferior a 5% das células epiteliais reativas no terço basal e com fraca intensidade da reação. (Continua).

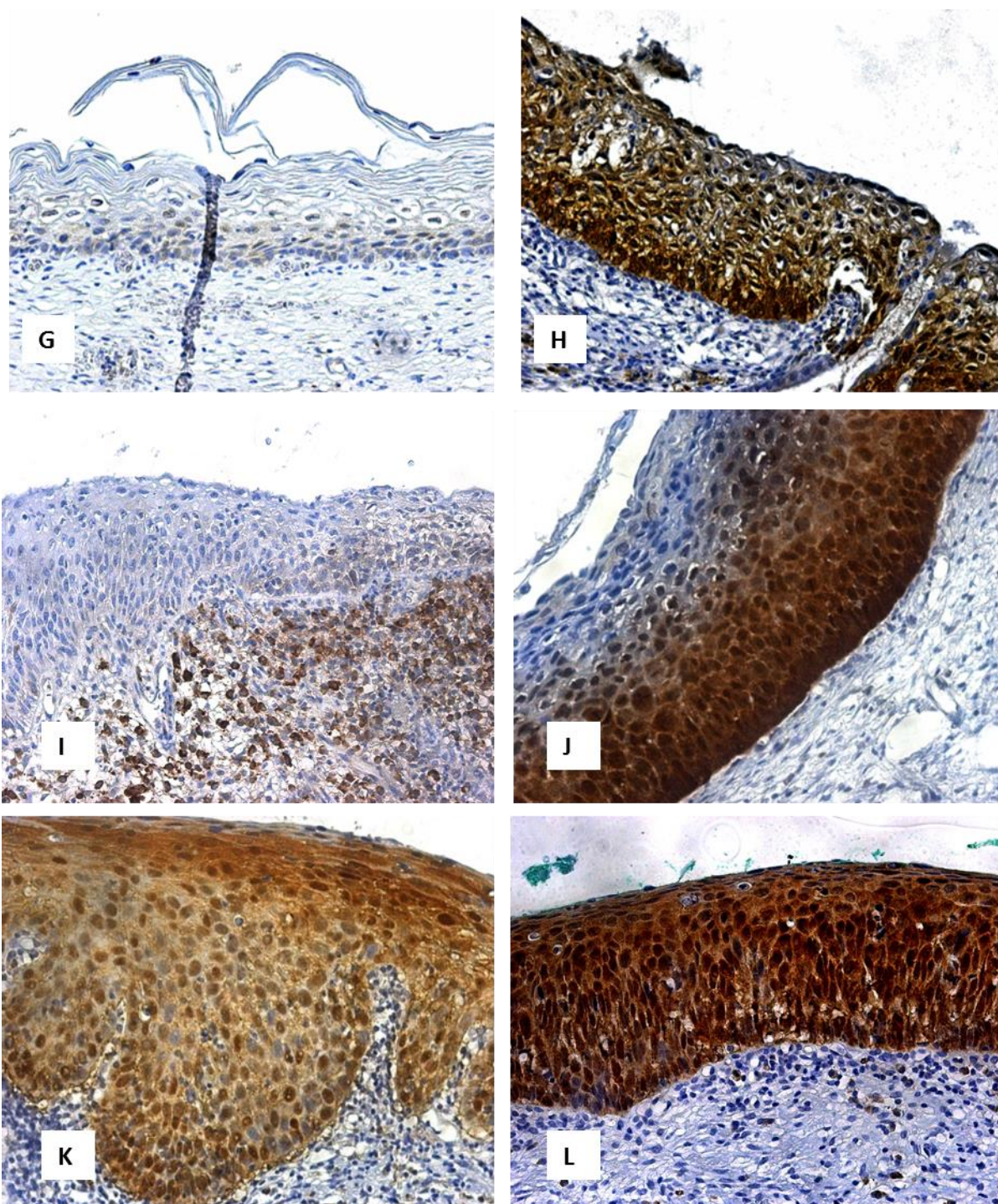


FIGURA 20 - Imuno-histoquímica de p16 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3. G) Mucosa escamosa com o percentual entre 5 a 25% das células epiteliais reativas no terço basal e com fraca intensidade da reação. H) Mucosa escamosa com percentual superior a 25% das células epiteliais reativas no terço basal e com média intensidade da reação. I) Mucosa escamosa do colo uterino com reatividade superior a 25% do percentual das células, com fraca intensidade, em dois terços da espessura do epitélio. J) Mucosa escamosa com o percentual superior a 25% das células epiteliais reativas em toda a espessura do epitélio e com forte intensidade da reação. K) Mucosa escamosa com o percentual superior a 25% das células epiteliais reativas em toda a espessura do epitélio e com média intensidade da reação. L) Mucosa escamosa com o percentual superior a 25% das células epiteliais reativas em toda a espessura do epitélio e com forte intensidade da reação (Conclusão).

Outra variável morfológica obtida a partir das análises imuno-histoquímicas dos biomarcadores RAP1, RAP GAP e p16 foi a localização intracelular, citoplasma e/ou núcleo, dessas proteínas (TABELA 12 e FIGURA 21).

TABELA 12

Localização celular dos biomarcadores RAP1, RAP GAP e p16 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3

BIOMARCADOR						
	CITOPLASMA		NÚCLEO E CITOPLASMA		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
MND						
RAP1	21	100,00	-	-	21	100,00
RAP1 GAP	14	100,00	-	-	14	100,00
p16	20	90,91	2	9,09	22	100,00
NIC 1						
RAP1	80	95,24	4	4,76	84	100,00
RAP1 GAP	41	97,62	1	2,38	42	100,00
p16	70	86,42	11	13,58	81	100,00
NIC 2/3						
RAP1	17	28,33	43	71,67	60	100,00
RAP1 GAP	17	47,22	19	52,78	36	100,00
p16	4	6,15	61	93,85	65	100,00

As proteínas RAP1 e p16 localizaram-se, predominantemente, no citoplasma das células da mucosa nos grupos MND e NIC 1, correspondendo a 21 (100,00%) e 80 (95,24%) para RAP1 e a 20 (90,91%) e 70 (86,42%) para p16. Foram observadas expressões tanto citoplasmática quanto nuclear de p16 em 11 (13,58%) dos 85 casos do grupo NIC 1. Entretanto, o predomínio da marcação simultânea, nuclear e citoplasmática, foi observado em 43 (71,67%) e 61 (93,85%) das amostras do grupo NIC 2/3, respectivamente para RAP1 e p16, com diferença estatisticamente significativa da localização citoplasma ($p=0,001$). A localização para RAP1 GAP apresentou características similares às proteínas RAP1 e p16, com predomínio citoplasmático nos grupos MDN e NIC 1 e citoplasmático e nuclear no grupo NIC 2/3. A FIGURA 21 abaixo ilustra esses resultados da localização celular.

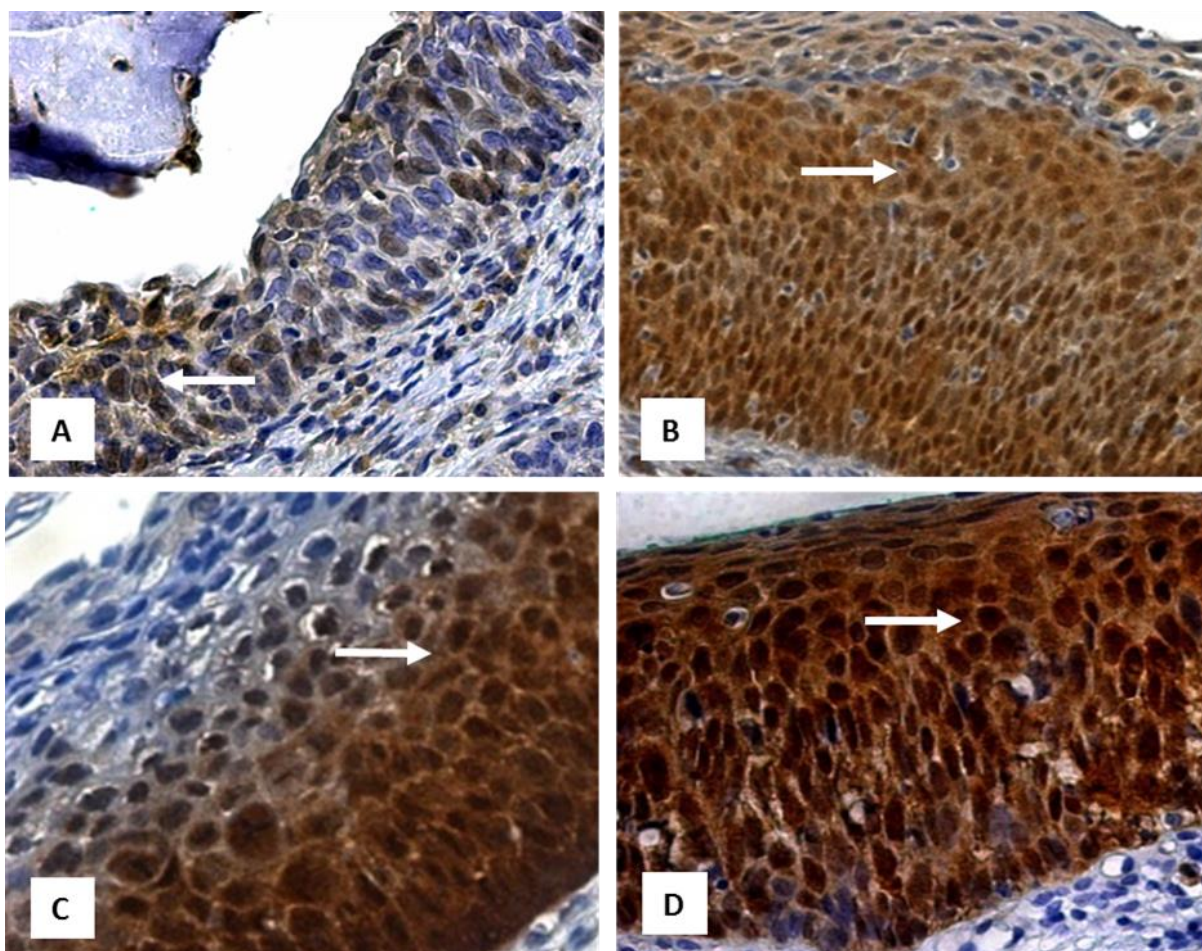


FIGURA 21 - Localização intracelular das proteínas RAP1 e p16 em amostras do grupo NIC 2/3. A e B) Epitélio escamoso com média e forte reatividade para RAP1, respectivamente. Observa-se predomínio da localização intracitoplasmática da proteína RAP1 e presença de células com marcação nuclear (setas). C e D) Epitélio escamoso com forte reatividade para p16. Observa-se predomínio da localização intracitoplasmática da proteína RAP1 e presença de células com forte marcação nuclear (setas) (A-D: aumento de 400X).

Além dos ensaios de imuno-histoquímica nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3 com os biomarcadores RAP1, RAP GAP, p16 e Ki67, foco principal desse estudo, foram também realizados experimentos de imuno-histoquímica nas amostras do grupo CCE, estágio final da história natural da neoplasia cervical associada à infecção por HPV, com os biomarcadores RAP1 e p16. As reações foram classificadas de acordo com os critérios adotados por Cubila *et al.* (2011). A TABELA 13 abaixo mostra os resultados da expressão imuno-histoquímica das proteínas RAP1 e p16 nas amostras do grupo CCE.

TABELA 13

Classificação imuno-histoquímica dos biomarcadores RAP1 e p16 nas amostras do grupo CCE

NÍVEL	BIOMARCADOR			
	RAP1		p16	
	N	%	N	%
0	1	1,59	1	1,59
1	5	7,94	1	1,59
2	39	61,90	17	26,98
3	18	28,57	44	69,84
TOTAL	63	100,00	63	100,00

Observaram-se predomínios do nível “2” de imunorreatividade nas reações do biomarcador RAP1 em 39 (61,90%) amostras e do nível “3” nas reações do biomarcador p16 em 44 (69,84%) dos casos, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação às proporções de imunorreatividade dos demais níveis. Também foram observadas diferenças significativas entre os biomarcadores RAP1 e p16. A FIGURA 22 abaixo ilustra os resultados do fenótipo dos biomarcadores RAP1 e p16 descritos acima e finaliza essa longa descrição morfológica dos resultados dos experimentos da imuno-histoquímica.

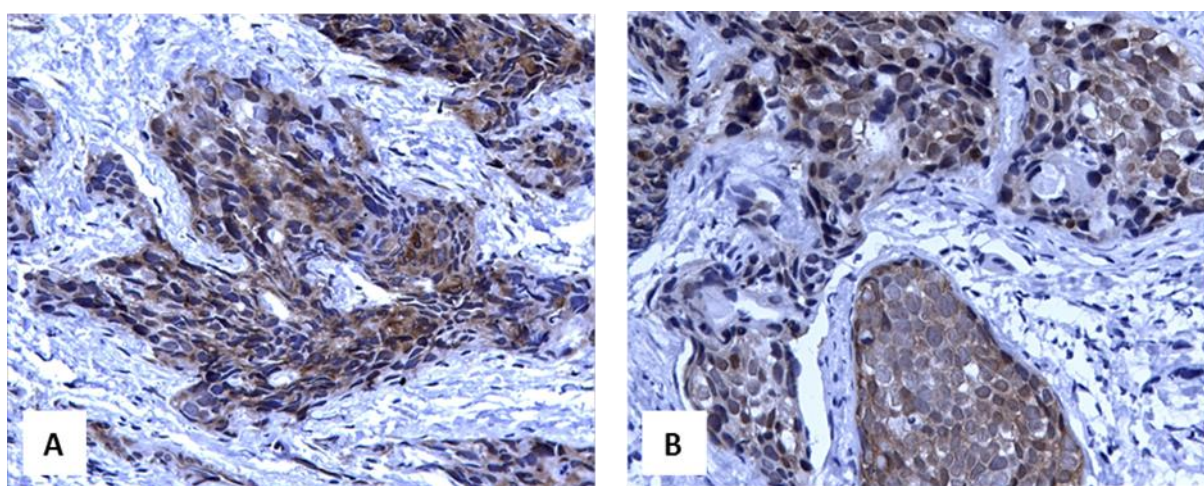


FIGURA 22 - Imuno-histoquímica para RAP1 (A) e p16 (B) segundo o diagnóstico morfológico de CCE. A e B) Massas de células escamosas atípicas apresentando reatividade intracitoplasmática e nuclear para os anticorpos anti-Rap1 e anti-p16, respectivamente.

4.4.2 – Modelo de regressão logística ordinal da imuno-histoquímica

O modelo de regressão logística ordinal da expressão imuno-histoquímica de RAP1 nas amostras adotou os seguintes parâmetros:

1º) Variáveis independentes ou preditoras: padrões ordenados de imuno-histoquímica de RAP1 nas amostras de NIC e CCE, conforme a descrição: 0: ausência de reatividade; 1: fraca e média reatividade em células distribuídas esporádica e focalmente no terço basal do epitélio; 2: média e forte reatividade em células distribuídas focal e difusamente no terço basal da espessura epitelial; 3: média e forte reatividade em células distribuídas difusamente em dois terços ou toda a espessura epitelial.

2º) Variáveis dependentes: grupos ordenados dos diagnósticos histopatológicos, conforme a descrição: A: mucosa não displásica (MND); B: neoplasia intraepitelial cervical de grau 1 (NIC 1); C: neoplasia intraepitelial cervical de grau 2/3 (NIC 2/3); D: carcinoma de células escamosas do colo uterino (SCC)

A fórmula do modelo, de acordo com a linguagem do software livre R, foi: `polr(formula = grupo ~ relevel(ihq, 1), data = dados, Hess = TRUE, method = "logistic")`, com *Residual Deviance*: 579.3991 e *AIC*: 591.3991. Os valores dos coeficientes e dos interceptos estão representados na TABELA 14 abaixo:

TABELA 14
Coeficientes e interceptos do modelo de regressão logística

COEFICIENTES E INTERCEPTOS	VALOR	DESVIO PADRÃO	VALOR t
relevel(ihq, 1) 1	0,9142	0,5713	1,600
relevel(ihq, 1) 2	2,6637	0,5905	4,511
relevel(ihq, 1) 3	3,3965	0,5935	5,723
MND NIC1	-0,0852	0,5232	-0,1628
NIC1 NIC2/3	2,2471	0,5563	4,0390
NIC2/3 CCE	3,6871	0,5741	6,4224

Uma interpretação do intercepto pode ser obtida fixando o valor da variável independente ou considerando a variável preditora igual a zero. Neste caso, conforme a fórmula abaixo, o modelo multinomial ordinal é definido somente pelo intercepto:

$$(P(Y \leq k | x=0)) / (P(Y > k | x=0)) = e^{\alpha_k} \quad a$$

onde $e^{\alpha_{\text{MND|NIC1}}} = 0.9183$, $e^{\alpha_{\text{NIC1|NIC2/3}}} = 9.4603$ e $e^{\alpha_{\text{NIC2/3|SCC}}} = 39.9289$. Este modelo, considerando somente o intercepto, indica principalmente a dinâmica com relação à progressão entre as classes da variável resposta: $\text{MND} < \text{NIC1} < \text{NIC2/3} < \text{CCE}$.

Os resultados mostram que a medida que são avaliadas as classes superiores, os valores do denominador da razão de chance, ou seja, $P(Y > k | x=0)$, decrescem, favorecendo a ocorrência das classes inferiores. Ou seja, considerando $k = \text{NIC2/3}$, o valor de $P(Y \leq \text{NIC2/3} | x=0)$, que corresponde a uma probabilidade acumulada, que tende para a unidade, ao passo $P(Y > \text{NIC2/3} | x=0)$ tende para zero, gerando um valor da razão de chance elevado $e^{\alpha_{\text{NIC2/3|CCE}}} = 39.9289$. Dessa forma, em geral, o efeito do intercepto no aumento da razão da chance é acumulativo, $\alpha_1 < \alpha_2 < \dots < \alpha_K$, pois está associado à ordem do grupo.

Com relação à base de dados, a variável independente é categórica e, portanto a interpretação do modelo multinomial ordinal está associada aos valores estimados para cada categoria. A categoria de referência do modelo é $\text{IHQ} = 0$. Considerando o modelo escrito na fórmula:

$$(P(Y \leq k | x_j)) / (P(Y > k | x_j)) = e^{\alpha_k + \beta_j} \quad b$$

onde β_j é o coeficiente associado à categoria j , em relação à referência $j=0$, da variável independente ($j=1,2,3$), os resultados indicam que com um aumento crescente das classes da variável independente ocorre um aumento da razão de chance, favorecendo a ocorrência das classes inferiores.

Uma interpretação alternativa pode ser obtida quando são considerados os valores estimados de probabilidade para as classes da variável resposta. Conforme apresentado na TABELA 15, para os diferentes valores da variável resposta, caso a variável dependente seja $\text{IHQ} = 0$, então as classes da variável resposta mais prováveis serão MND e NIC1 , com probabilidade 0.9044. Caso a variável dependente seja $\text{IHQ} = 1$, então a classe NIC1 terá probabilidade maior que 50% (0.5223). A ocorrência de $\text{IHQ} = 2$ favorece ocorrência das classes NIC1 , NIC2/3 e CCE com probabilidade 0.9399. Finalmente, a ocorrência de $\text{IHQ} = 3$ favorece a ocorrência das classes NIC2/3 e SCC com probabilidade 0.7594.

TABELA 15

Valores estimados de probabilidade para diferentes categorias da variável resposta

IHQ	GRUPO DIAGNÓSTICO			
	MND	NIC 1	NIC 2/3	CCE
0	0,4787	0,4257	0,0712	0,0244
1	0,2691	0,5223	0,1499	0,0588
2	0,0601	0,3372	0,3383	0,2644
3	0,0298	0,2108	0,3315	0,4278

Considerando o modelo e os valores estimados de probabilidade definidos acima, as associações entre a expressão de RAP1 e o risco de NIC e CCE foram calculadas, em termos de razão de chances ou *Odds ratios* (OR), e demonstradas na TABELA 16 abaixo:

TABELA 16

Odds ratios (OR) para as associações entre RAP1 e o risco de NIC e CCE

PROGRESSÃO	OR	IC 95%	VALOR p
MND / NIC 1	0,92	0,33 – 2,56	<0.001
NIC 1 / NIC 2/3	9,46	3,18 – 28,15	<0.001
NIC 2/3 / CCE	39,93	12,96 – 123,02	<0.001

A TABELA 16 sumariza as *Odds ratios* (OR) e intervalos de confiança de 95% para a associação entre a expressão de RAP1 e grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3. Foi observado um pequeno risco de progressão NDM para NIC 1 (OR=0.92; 95% CI 0.33-2.56). Entretanto, aumento na expressão de RAP1 foi associado com aumento de aproximadamente 10 vezes no risco de progressão de NIC 1 para NIC 2/3 (OR=9.46; 95% CI 3.18-28.15) e aumento de aproximadamente 40 vezes no risco de progressão de NIC 2/3 para CCE (OR=39.93, 95% CI 12.96-123.02).

Assim, esse modelo de regressão logística ordinal encerra a apresentação dos resultados descritivos e categóricos das classificações da imuno-histoquímica dos biomarcadores RAP1, RAP1GAP, p16 e Ki67, que enfatizaram a associação de RAP1 com a história natural e progressão da neoplasia intraepitelial cervical para o carcinoma de células escamosas do colo uterino.

4.5 – Morfometria

A análise da avaliação da intensidade relativa (RI) da expressão das proteínas RAP1 e p16 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3, conforme o trabalho de Furstenau *et al.* (2011), está representada no GRÁFICO 5 abaixo. Foram observados maiores níveis de RI dos biomarcadores RAP1 e p16 no grupo NIC 2/3, quando comparado aos grupos MND e NIC 1, além de maiores níveis de RI desses mesmos biomarcadores no grupo NIC 1, quando comparado ao grupo MND. Em todas essas comparações, o Teste T apresentou resultados de $p < 0,05$. Não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os níveis de RI dos biomarcadores RAP1 e p16 nos grupos MND e NIC 1, mas existiu importante diferença entre os níveis de RI no grupo NIC 2/3.

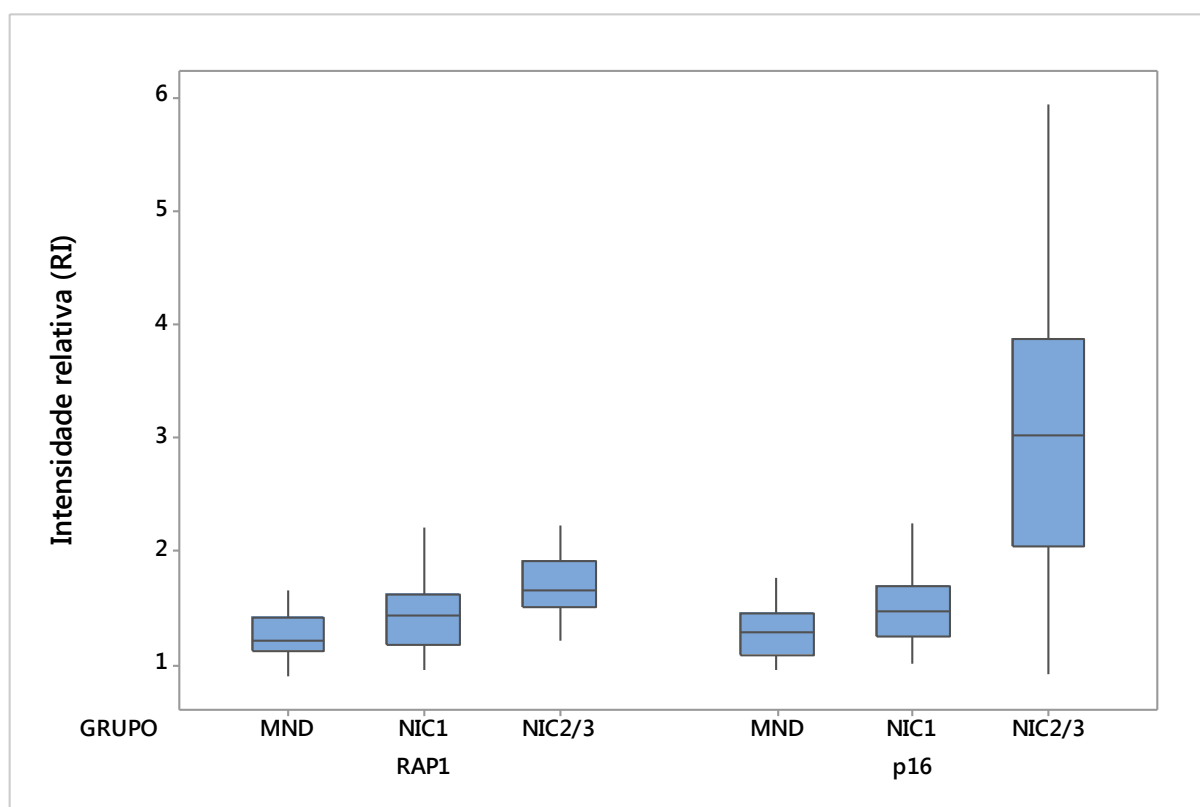


GRÁFICO 5 - Intensidade relativa (RI) da expressão de RAP1 e p16 nos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3. Os resultados das amostras dos grupos MND (n=18), NIC 1 (n=50) e NIC 2/3 (n=32). são apresentados em *boxplots* que exibem as medianas de cada grupo. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a RI de todos os grupos de cada biomarcador e entre a RI de RAP1 e p16 no grupo NIC 2/3.

Quando estratificada pela presença ou não do HPV, a intensidade relativa (RI) da expressão das proteínas RAP1 e p16 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e

NIC 2/3 apresentou diferenças estatisticamente significativas somente no grupo NIC 2/3 de p16. Em todos os demais grupos, não foram observadas diferenças entre as amostras positivas e negativas para o HPV (GRÁFICO 6).

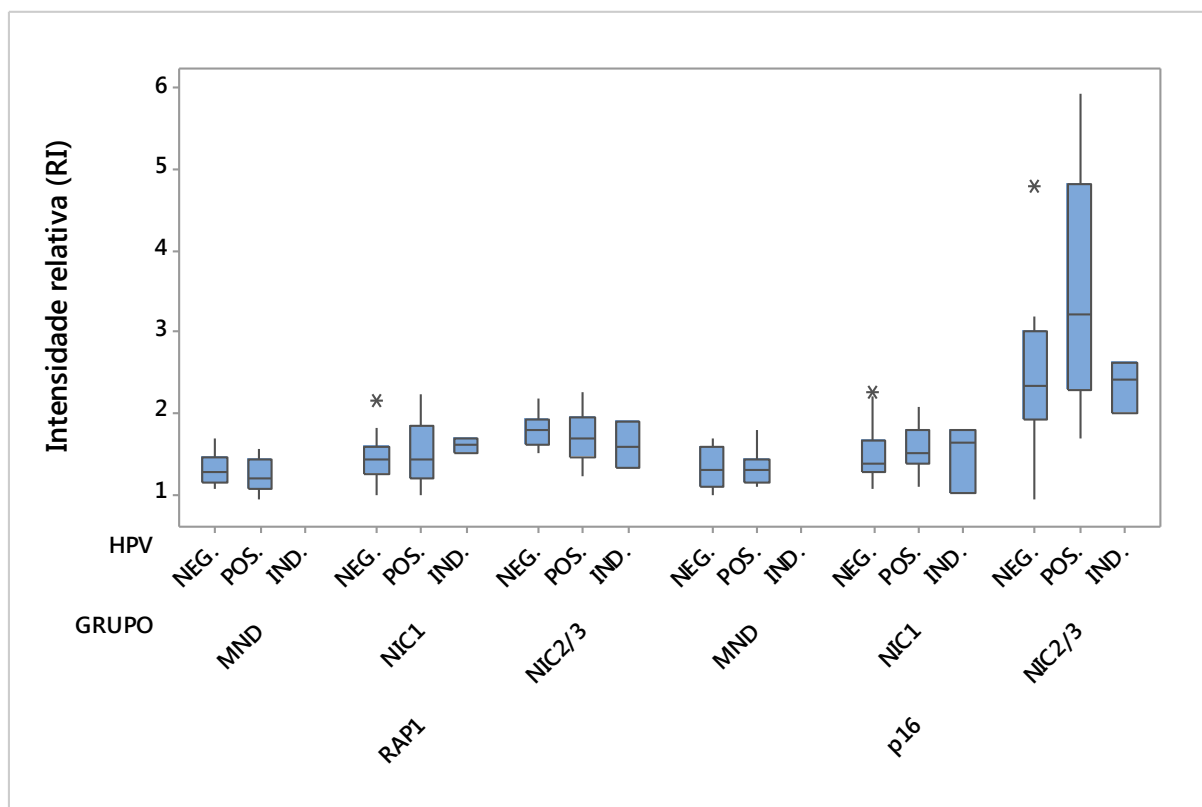


GRÁFICO 6 - Intensidade relativa (RI) da expressão de RAP1 e p16 nos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3 estratificada pelo resultado da detecção do HPV por PCR. Os resultados das amostras dos grupos MND (n=18), NIC 1 (n=50) e NIC 2/3 (n=32) são apresentados em *boxplots* que exibem as medianas de cada grupo. Foi observada diferença estatisticamente significativas somente entre a RI dos casos positivos e negativos da expressão do biomarcador p16 no grupo NIC 2/3. NEG. = Negativo; POS. = Positivo; IND. = Indeterminado.

Os resultados da RI, finalizando esse tópico sobre “Morfometria” também foram avaliados por análises de correlação e regressão linear entre a expressão das proteínas RAP1 e p16 nos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3. Houve correlação positiva, estatisticamente significativa, entre a expressão de RAP1 e p16 nos grupos MND ($r=0,6548$; $p=0,0032$) e NIC 1 ($r=0,3591$; $p=0,0104$). Entretanto, não foi observada correlação estatisticamente significativa entre a RI da expressão dessas proteínas no grupo NIC 2/3 ($r=0,2617$; $p=0,1349$). O GRÁFICO 7 abaixo ilustra essas análises de correlação:

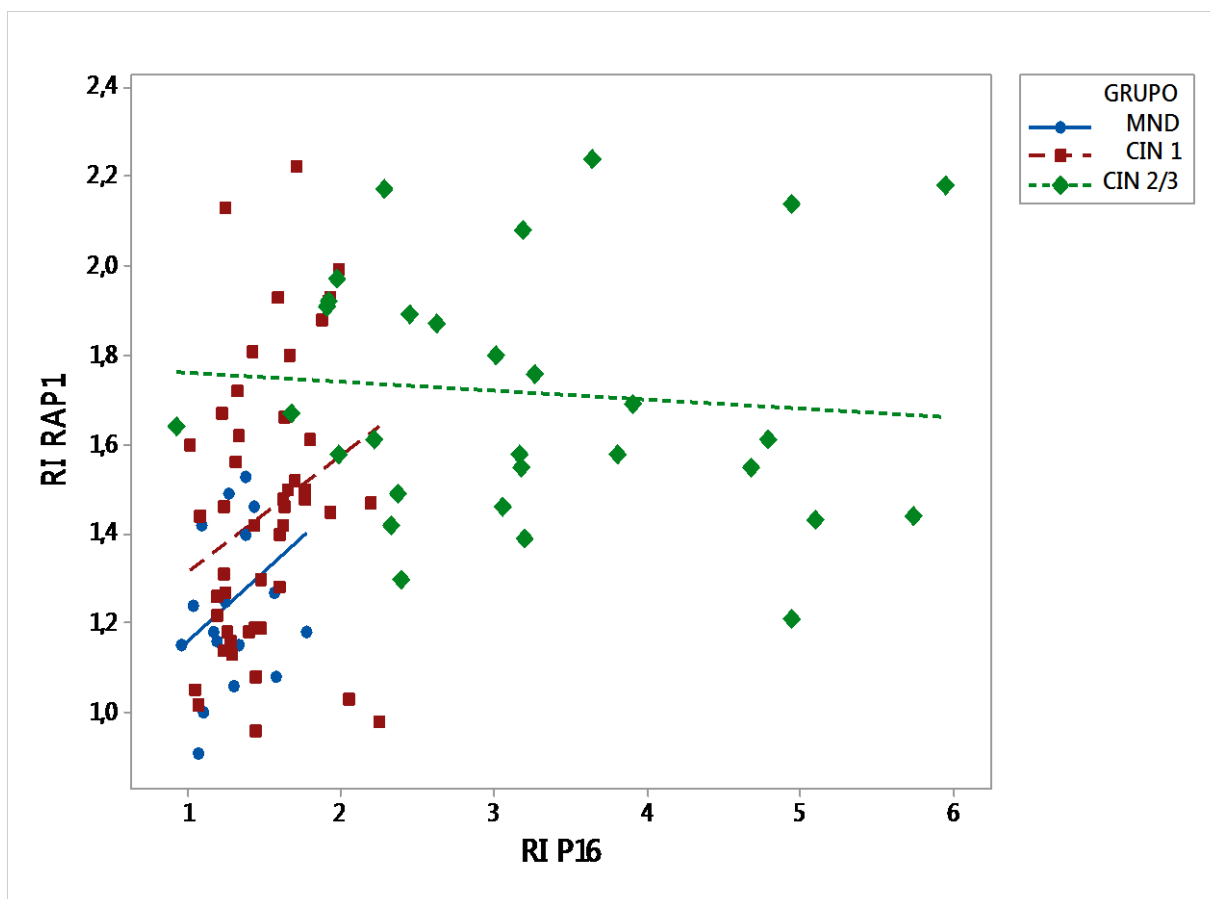


GRÁFICO 7 - Correlação das intensidades relativas (RI) de expressão das proteínas RAP1 e p16 nos grupos MND, CIN 1 e CIN 2/3. Foram observadas correlações positivas e estatisticamente significativas entre as RI de RAP1 e p16 nos grupos MND ($r=0,6548$; $p=0,0032$) e CIN 1 ($r=0,3591$; $p=0,0104$). Não foi observada correlação significativa entre a RI dessas proteínas no grupo CIN 2/3 ($r=0,2617$; $p=0,1349$).

Entretanto, antes do encerramento desse tópico e apresentação dos resultados das expressões gênicas celulares de RAP1A, RAP1B e p16, último tópico dos resultados, salienta-se o seguinte e importante resultado da morfometria, a partir da interpretação do gráfico de dispersão acima (GRÁFICO 7): houve grande proximidade de distribuição dos níveis de RI dos grupos MND e CIN 1. Diferentemente dos valores de RI das amostras do grupo CIN 2/3, representados pelos pontos de cor verde no referido gráfico (GRÁFICO 7), que se dispersaram muito, principalmente no eixo das abscissas (RI P16), os valores das amostras dos grupos MND e CIN 1, representados pelos pontos de cores azul e vermelha, respectivamente, se concentraram em áreas muito aproximadas, entre os valores 0 e 2,5 de RI, tanto para RAP1, quanto para p16. E, nessas áreas, as amostras dos grupos MND e CIN 1 também apresentaram retas de regressão com inclinações praticamente similares.

4.6 – Expressão gênica das proteínas RAP1A, RAP1B e p16

Os resultados abaixo (GRÁFICO 8) representam os achados da avaliação da expressão relativa dos genes celulares RAP1 e p16 pelo método Delta-Delta CT, conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001). Como RAP1, tem duas isoformas, RAP1A e RAP1B (Lafuente *et al.*, 2007), são apresentados resultados dos dois genes em comparação com o gene p16, tendo o gene constitutivo β -actina, como referência endógena e uma amostra negativa do grupo MND como normalizadora de todas as reações. Os genes alvos RAP1GAP e C3G e os genes constitutivos GAPDH e RLP29, não apresentaram amplificação nos experimentos de validação, necessários para determinação da eficiência e comparação entre amostras, motivo da exclusão intencional de maior explanação sobre seus resultados.

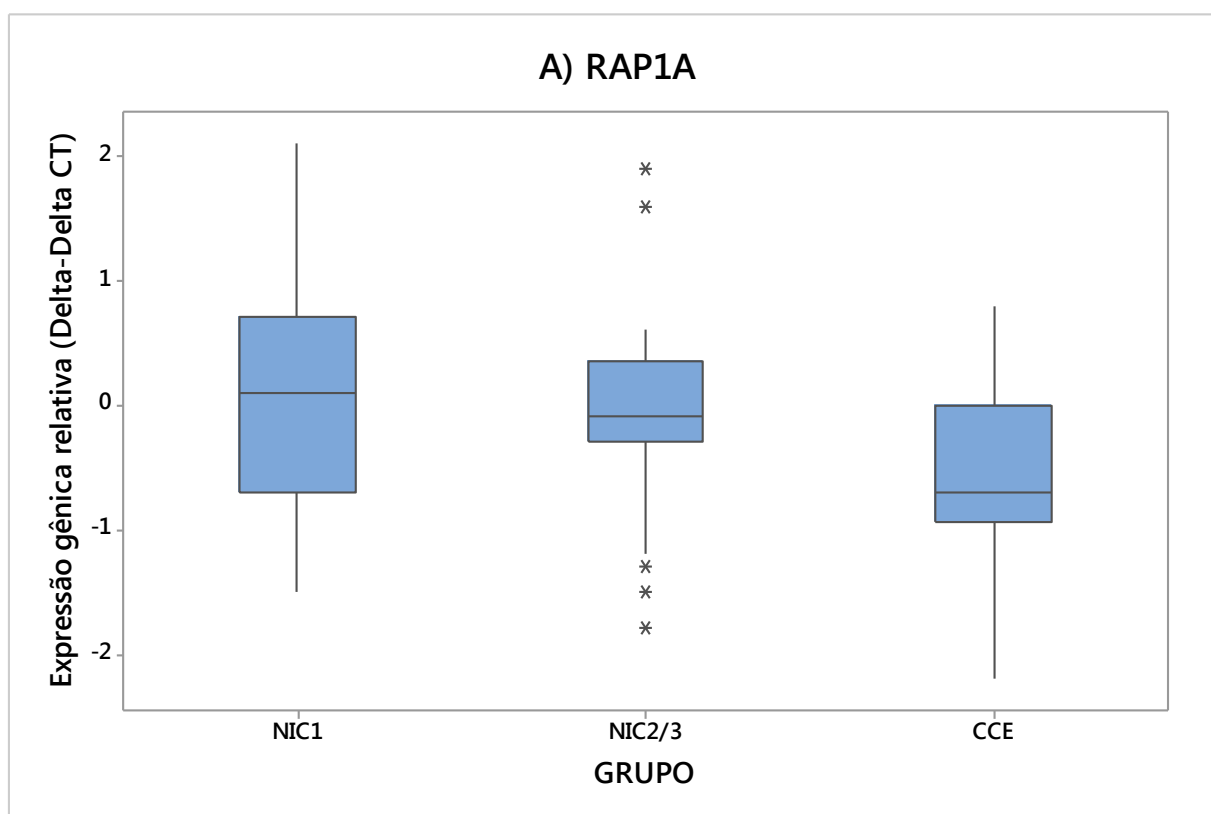


GRÁFICO 8 – Expressão gênica relativa das proteínas RAP1A, RAP1B e p16, nos grupos NIC 1, NIC 2/3 e CCE, pelo método Delta-Delta CT. A) RAP1A. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) o grupo CCE e os grupos NIC 1 e NIC 2/3. (Continua).

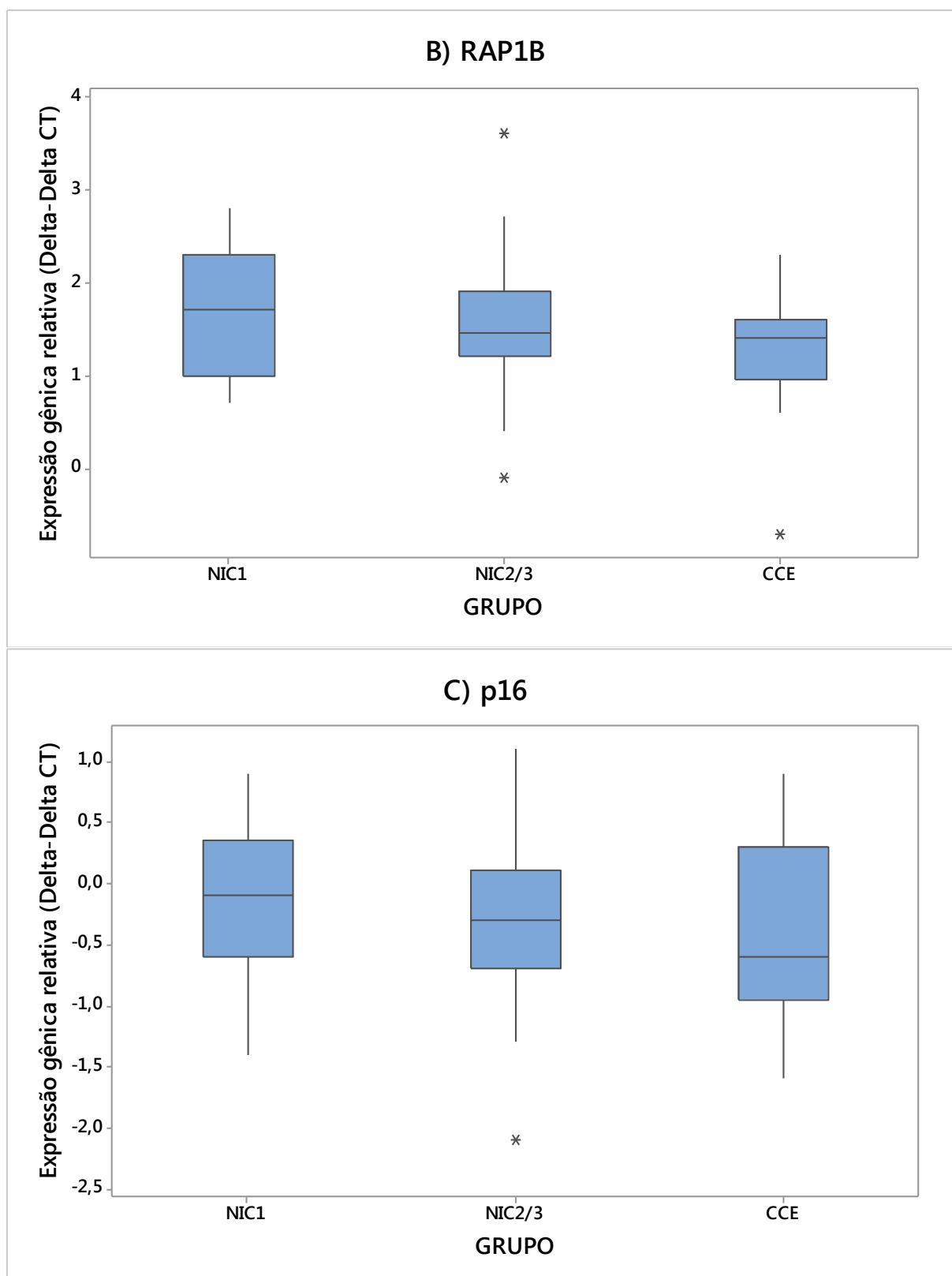


GRÁFICO 8 – Expressão gênica relativa das proteínas RAP1A, RAP1B e p16, nos grupos NIC 1, NIC 2/3 e CCE, pelo método Delta-Delta CT. B) RAP1B; C) p16. Não foram observadas diferenças significativas da expressão dos biomarcadores RAP1B e p16 nos grupos NIC 1, NIC 2/3 e CCE. (Conclusão).

Os dados demonstram menor expressão gênica relativa de RAP1A (GRÁFICO 8A) em amostras de pacientes do grupo CCE quando comparadas aos grupos NIC 1 e NIC 2/3 ($p < 0,05$). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada para a análise de expressão gênica relativa de RAP1B e p16 em amostras de pacientes dos grupos NIC 1, NIC 2/3 e CCE (GRÁFICOS 8B e 8C).

Alternativamente, a expressão relativa dos genes celulares RAP1A, RAP1B e p16 também foi avaliada pelo método de quantificação da diferença da expressão gênica (rER), conforme descrito por *Scheffe et al.* (2006). O GRÁFICO 9 abaixo apresenta os resultados da avaliação da expressão relativa dos genes celulares RAP1A, RAP1B e p16 pelo método de quantificação da diferença da expressão gênica (rER):

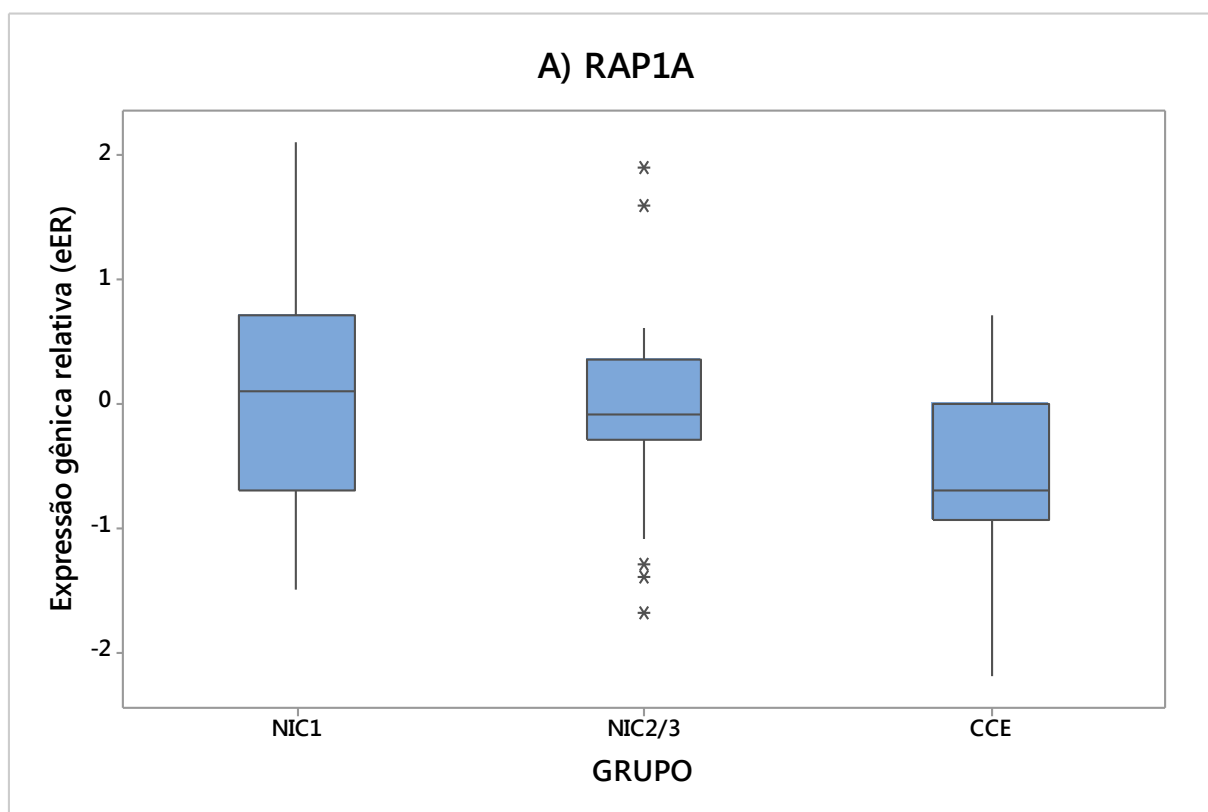


GRÁFICO 9 – Expressão gênica relativa das proteínas RAP1A, RAP1B e p16, nos grupos NIC 1, NIC 2/3 e CCE, pelo método rER. A) RAP1A. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) o grupo CCE e os grupos NIC 1 e NIC 2/3. (Continua).

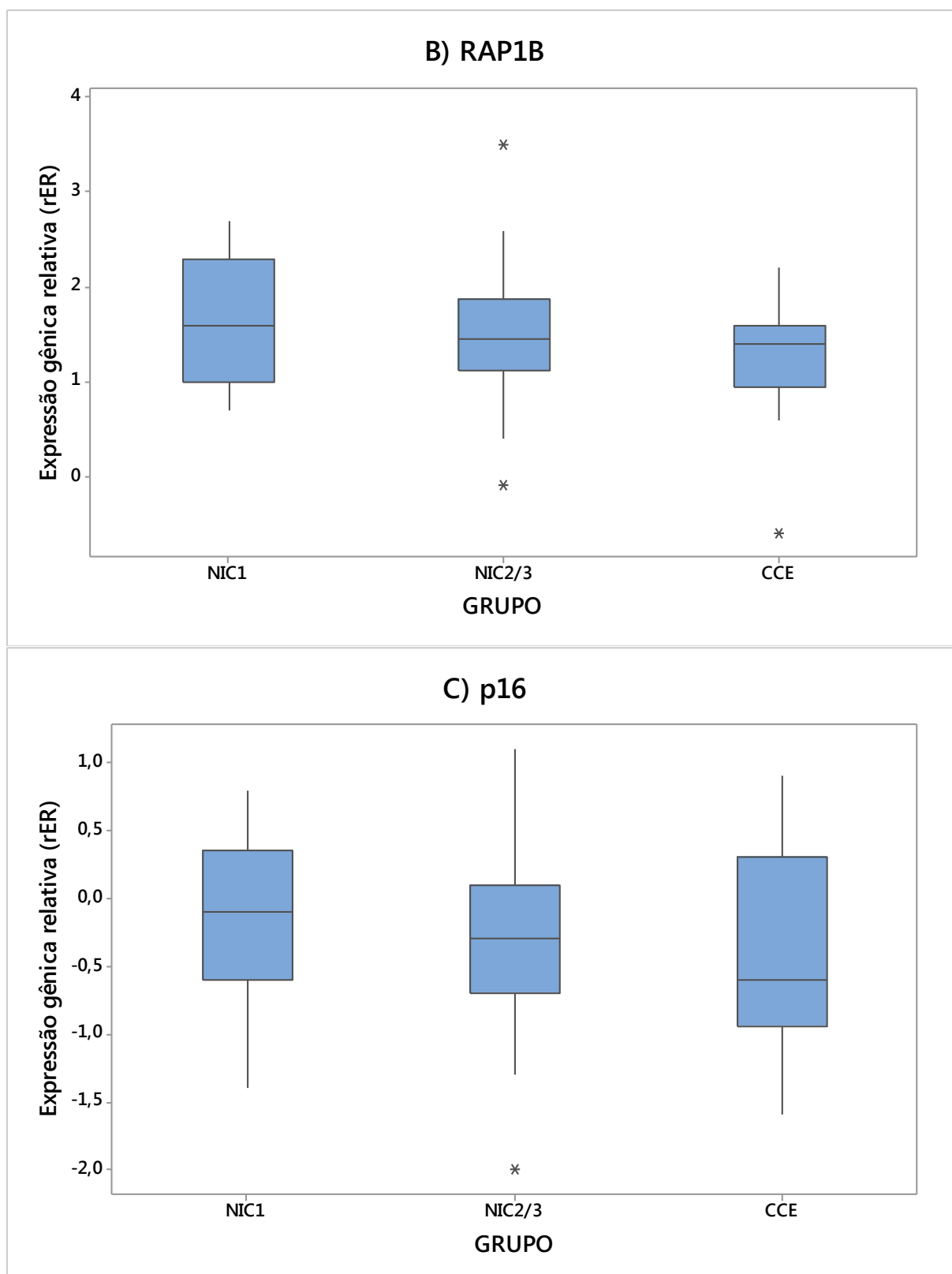


GRÁFICO 9 – Expressão gênica relativa das proteínas RAP1A, RAP1B e p16, nos grupos NIC 1, NIC 2/3 e CCE, pelo método rER. B) RAP1B; C) p16. Não foram observadas diferenças significativas da expressão dos biomarcadores RAP1B e p16 nos grupos NIC 1, NIC 2/3 e CCE. (Conclusão).

Os dados também demonstram menor expressão gênica relativa de RAP1A (GRÁFICO 9A) em amostras de pacientes do grupo CCE quando comparadas aos grupos NIC 1 e NIC 2/3 ($p < 0,05$). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada para a análise de expressão gênica relativa de RAP1B e p16 em amostras de pacientes dos grupos NIC 1, NIC 2/3 e CCE (GRÁFICOS 9B e 9C)

Por último, foram realizadas análises de correlação e regressão linear entre as expressões gênicas relativas de RAP1A, RAP1B e p16 nos grupos NIC 1, NIC 2/3 e CCE, que estão ilustradas no GRÁFICO 10 abaixo:

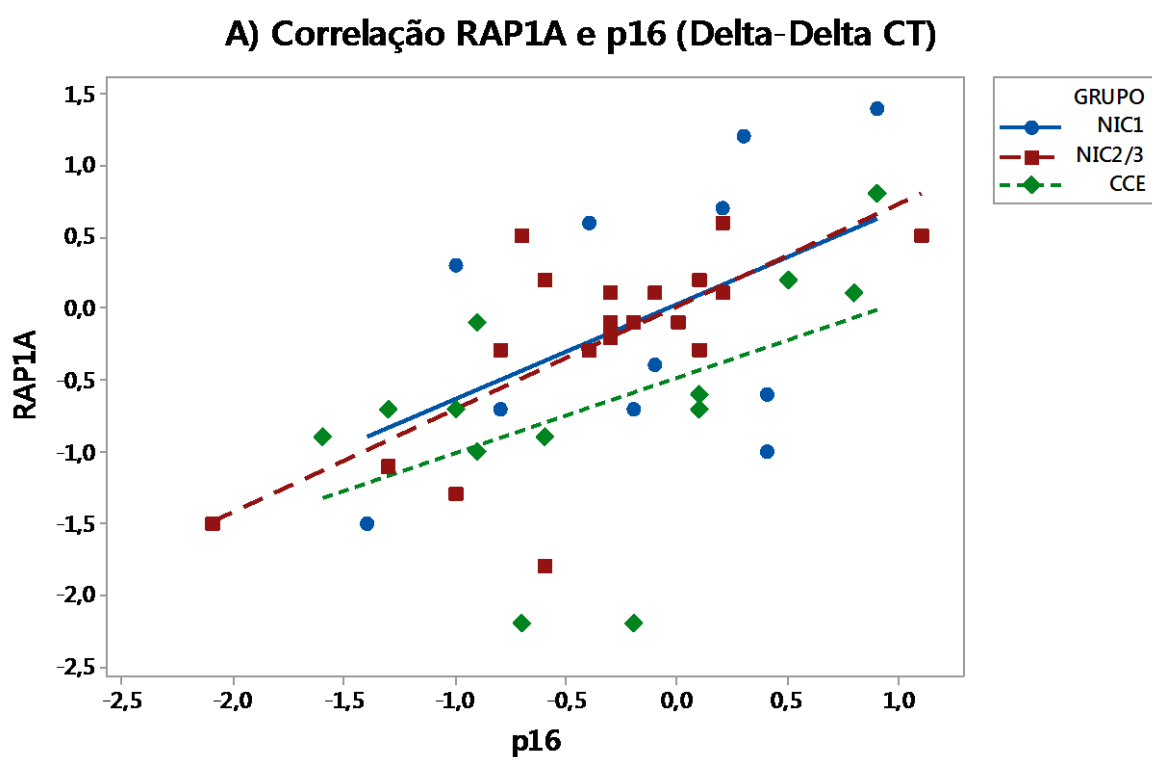


GRÁFICO 10 - Análise de correlação da expressão gênica relativa de RAP1A, RAP1B e p16, pelos métodos Delta-Delta CT e rER, entre os grupos NIC1, NIC2/3 e CCE. A) Correlação RAP1A e p16 (Delta-Delta CT). Foram encontradas as seguintes correlações de Pearson para cada grupo: NIC1) 0,483 ($p = 0,094$); NIC2/3) 0,701 ($p = 0,001$); e CCE) 0,493 ($p = 0,087$). (Continua).

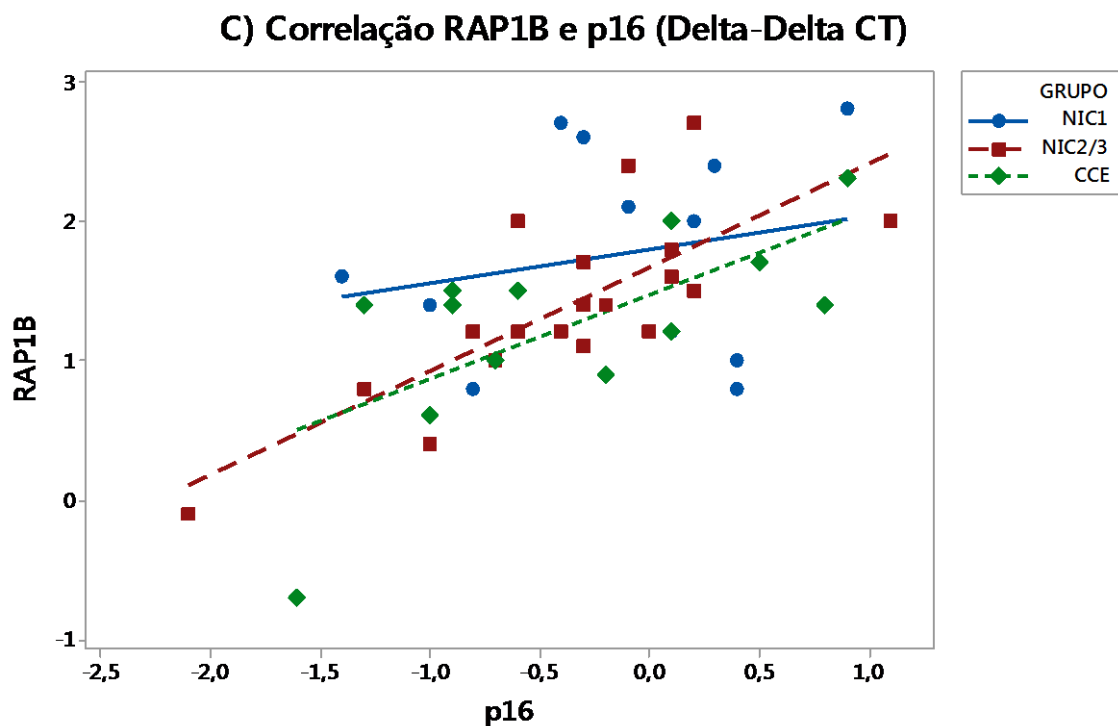
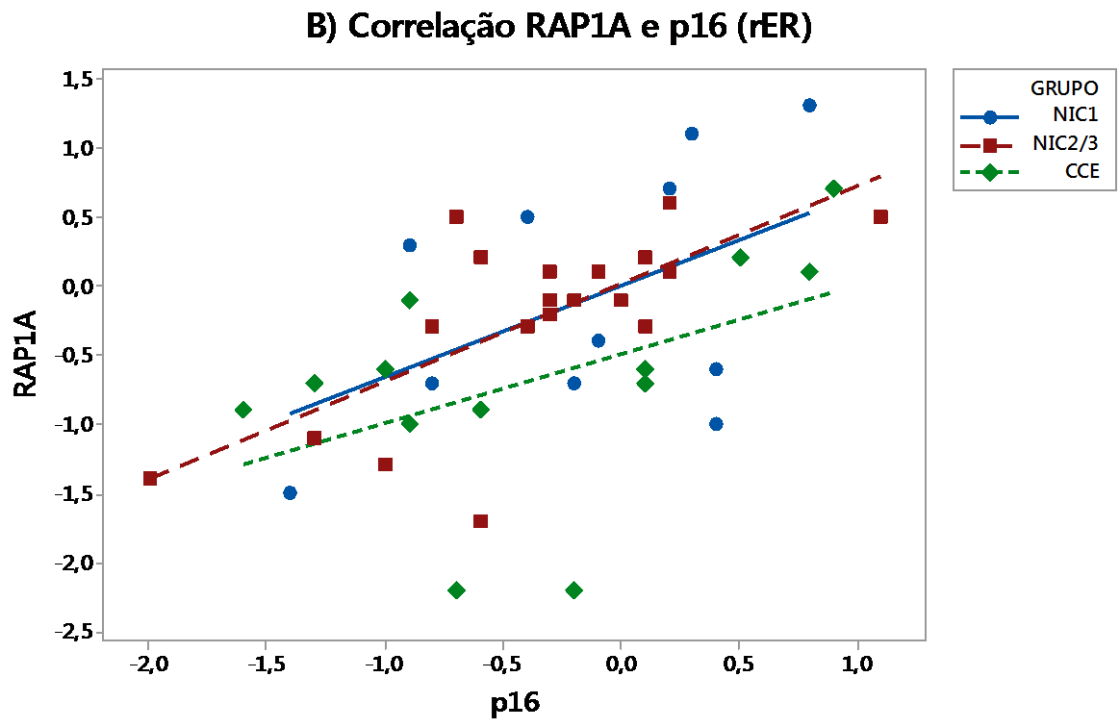


GRÁFICO 10 - Análise de correlação da expressão gênica relativa de RAP1A, RAP1B e p16, pelos métodos Delta-Delta CT e rER, entre os grupos NIC1, NIC2/3 e CCE. B) Correlação RAP1A e p16 (rER). Foram encontradas as seguintes correlações de Pearson para cada grupo: NIC1) 0,485 ($p = 0,093$); NIC2/3) 0,700 ($p = 0,001$); e CCE) 0,477 ($p = 0,099$); C) Correlação RAP1B e p16 (Delta-Delta CT). Foram encontradas as seguintes correlações de Pearson para cada grupo: NIC1) 0,213 ($p = 0,484$); NIC2/3) 0,765 ($p = 0,000$); e CCE) 0,659 ($p = 0,014$) (Continua).

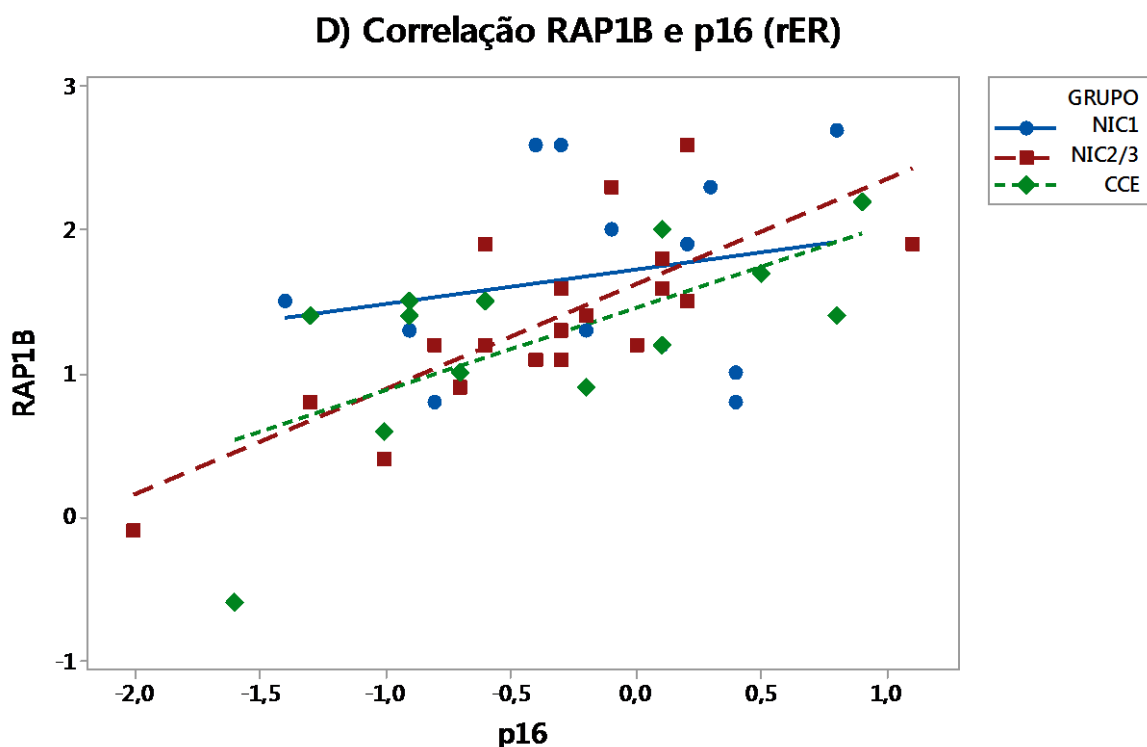


GRÁFICO 10 - Análise de correlação da expressão gênica relativa de RAP1A, RAP1B e p16, pelos métodos Delta-Delta CT e rER, entre os grupos NIC1, NIC2/3 e CCE. A) Correlação RAP1B e p16 (rER). Foram encontradas as seguintes correlações de Pearson para cada grupo: NIC1) 0,213 ($p = 0,485$); NIC2/3) 0,769 ($p = 0,000$); e CCE) 0,653 ($p = 0,015$). (Conclusão).

Em resumo, essas análises quantitativas da expressão gênica por qPCR encerram os RESULTADOS desse estudo e, juntamente com as análises qualitativas das três classificações morfológicas da imuno-histoquímica e semi-quantitativa da morfometria, fortalecem as evidências que candidatam a proteína RAP1 à função de biomarcador da neoplasia intraepitelial cervical associada à infecção pelo HPV, posição que será discutida a seguir.

5 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

“*Strong evidence now supports the adoption of cervical cancer prevention strategies that explicitly focus on persistent infection with the causal agent, human papillomavirus (HPV)*”. Assim Mark Schiffman, uma das maiores autoridades do mundo em prevenção do câncer cervical, introduz seu mais recente estudo (Schiffman *et al.*, 2011). Ou seja, o foco na infecção persistente pelo HPV, e não na sua consequência tardia – o câncer cervical – está novamente e agora com mais força na base do planejamento dos principais programas de Saúde Pública quanto à prevenção do câncer do colo uterino.

Desta forma, o desenvolvimento de biomarcadores celulares com os objetivos de diagnosticar, prever a progressão para neoplasia e tratar a infecção persistente pelo HPV poderia contribuir para o controle da própria infecção pelo HPV, a mais comum doença sexualmente transmissível do mundo, e, fundamentalmente, o câncer cervical.

Desde a introdução do teste de Papanicolaou, em 1941, há vasta literatura sobre as limitações da citologia no rastreamento do câncer cervical, apesar da inquestionável contribuição do método no diagnóstico ou na redução da mortalidade por carcinoma do colo uterino. Os maiores problemas concentram-se não apenas em questões pré ou analíticas do teste, mas particularmente na restrição do diagnóstico acurado pela própria história natural da infecção por HPV (Thomison *et al.*, 2008). A FIGURA 31 desta tese mostra isso com clareza. O exame citológico das células superficiais da mucosa cervical lá demonstrada apresentaria, como de fato ocorreu, resultado falso negativo.

A necessidade e o uso dos testes para detectar a presença e quantificar o DNA do HPV em amostras cervicais, conhecidos como testes DNA-HPV, são fortalecidos com o consenso sobre a relevância da infecção persistente pelo HPV como base para implementação de estratégias de prevenção do câncer cervical. Entretanto, estes testes apresentam enormes desafios a serem superados para sua incorporação nos programas de prevenção e na rotina clínica ginecológica como, por exemplo, a insuficiência na triagem da neoplasia intraepitelial cervical, dificuldades na distinção entre infecção transitória e persistente, grande variabilidade nas estimativas de sensibilidade e especificidade, com uma média de 84% (variação de 55% a 100%) e 77% (variação de 31% a 96%), respectivamente, e a mudança de cultura médica para melhor aderência às necessidades da metodologia (Caetano *et al.*, 2006; Tsoumpou *et al.*, 2009; Schiffman *et al.*, 2011).

No que se refere à aplicação clínica de p16 como biomarcador da neoplasia intraepitelial cervical, os dados deste trabalho, realizado com uma amostragem muito representativa e composta por 319 biópsias cervicais de pacientes entre 18 e 74 anos, são concordantes com as principais observações de grande número de autores (Klaes *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2005; Lorenzato *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2005; Kalof e Cooper, 2006; Thomison *et al.*, 2008; Tsoumpou *et al.*, 2009).

A maioria desses trabalhos utiliza a classificação pioneira de Klaes (2001), que considera, separadamente, a interpretação sobre o percentual de células atípicas presentes no epitélio, a distribuição destas células e a intensidade da imunorreação. A classificação de Klaes (2001) é a base para a interpretação e comparação de toda a imuno-histoquímica no presente trabalho.

Inicialmente, destacam-se os principais resultados encontrados sobre imuno-histoquímica para p16, que consolidam os dados da meta-análise de Tsoumpou (2009), sobre os mais frequentes percentuais de forte reatividade, e são concordantes com o trabalho de Walts (2009), acerca da estimativa do ponto de corte entre normoexpresso e hiperexpresso, o que corresponde, na classificação de Klaes (2001), aos valores abaixo da média e a partir da forte reatividade, respectivamente. Somente 3% das amostras do grupo MND e 16,47% das amostras do grupo NIC 1 do estudo demonstraram forte reatividade para p16, enquanto para as amostras do grupo NIC 2/3 o resultado foi 89,86%. Esta relação direta entre o grau da neoplasia cervical e a intensidade da coloração de p16 suporta o uso desta proteína como marcador específico da NIC de alto grau, fortalecendo assim o papel complementar da imuno-histoquímica na avaliação morfológica das biópsias do colo uterino.

Outra referendada característica sobre imuno-histoquímica para p16 observada foi o nítido predomínio de marcação de células displásicas, difusamente distribuídas em toda a espessura do epitélio no grupo NIC 2/3, em contraste com o percentual predominantemente focal de células distribuídas no terço basal do epitélio presente nos grupos MND e NIC 1. Este achado ratifica a ruptura biológica existente entre as lesões de baixo e alto graus (Thomison *et al.*, 2008).

Em nosso estudo, além da classificação imuno-histoquímica para p16 conforme os critérios de Klaes (2001), foram aplicados os critérios de Galgano (2010). No trabalho deste autor, encontra-se uma categorização dos critérios de Klaes (2001) em níveis descritivos das características da imunorreatividade e a

inclusão do anticorpo primário anti-Ki67 para comparação com p16. Trata-se de uma categorização sintética e prática das mais prováveis combinações das variáveis independentes de Klaes (2001).

Os resultados obtidos pela classificação de Galgano (2010) para p16 foram correspondentes com a classificação imuno-histoquímica de Klaes (2001). Observaram-se também, claramente, os menores níveis relacionados com as amostras dos grupos MND e NIC 1 e o maior nível com o grupo NIC 2/3. Apenas dois casos (2%) do grupo NIC 1 foram classificados com o nível 3. Nestes dois casos, foi fundamental a comparação com o resultado da imuno-histoquímica para Ki67. Este marcador da proliferação celular contribui para resolução de dúvidas quanto à classificação morfológica com p16.

No que diz respeito à reação das amostras do grupo CCE, observou-se positividade da reação na quase totalidade dos casos, 62 (98,41%) em 63 casos, com predomínio da coloração em todas as células das amostras teciduais. Estes dados sustentam a superexpressão de p16 no câncer cervical, uma importante diferença da subexpressão que é observada em muitos tipos de neoplasias, como carcinoma colônico (Romagosa *et al.*, 2011).

Por fim, sobre a hiperexpressão de p16 associada à progressão do câncer cervical, salientam-se as recentes evidências do papel de p16 na resposta ao tratamento e na determinação do prognóstico após radioterapia para carcinomas escamosos da cabeça e pescoço (Lassen *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2010). Como a explicação destes fatos pode estar relacionada à diferentes localizações subcelulares de p16 (Romagosa *et al.*, 2011), os resultados até aqui observados, relacionados à imuno-histoquímica de p16, particularmente sobre a significativa expressão citoplasmática de uma proteína nuclear, também permitem uma reflexão sobre o melhor uso deste biomarcador na neoplasia cervical, ainda que estudos proteômicos e pós-translacionais, além das pouquíssimas referências existentes sobre regulação da expressão de p16, sejam necessários para o seu melhor entendimento.

Não há dúvidas, como discutido até aqui, do papel de p16 no diagnóstico da neoplasia intraepitelial cervical de alto grau e do carcinoma invasor do colo uterino. Se coubesse alguma contestação, provavelmente ela recairia sobre aspectos técnicos da imuno-histoquímica ou subjetivos do observador.

Para limitar ou restringir qualquer viés relacionado à imuno-histoquímica, foi acrescentada ao estudo uma estratégia de morfometria, similar à descrita por Furstenau (2010), para quantificar, precisamente, a mais polêmica das variáveis de KLAES, a intensidade da reação, cujos valores são influenciados pela força da reação antígeno-anticorpo, condições gerais de temperatura e pH da reação e, fundamentalmente, o viés do observador (Kalof *et al.*, 2005; Tsoumpou *et al.*, 2009).

A FIGURA 28 sintetiza todos os resultados mais relevantes da quantificação da intensidade da imunorreatividade de anti-p16 nas amostras dos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3 utilizando a estratégia da intensidade relativa (RI). Sobre os resultados de RI de p16, observa-se uma reprodução quase idêntica da observação por microscopia óptica convencional, ou seja, a reprodução polarizada da expressão de p16 entre lesões de baixo grau e lesões de alto grau. Somam-se a estes resultados a forte correlação da expressão de p16 com a presença de HPV na NIC de alto grau e no CCE, 56,79% e 78%, respectivamente. .

Todos esses resultados consolidam a possibilidade do uso de p16 como biomarcador da transformação celular por HPV. O fenômeno da transformação pode ocorrer, tardiamente, no curso da infecção por HPV e está intimamente associado à integração do DNA viral no genoma do hospedeiro, com posterior superexpressão da oncoproteína viral E7 e inibição da proteína supressora de tumor pRb. A inatividade da pRb proporciona liberação do fator E2F e proliferação celular descontrolada. Em conjunto, estas alterações induzem superexpressão de p16. Assim, há uma hiperexpressão de p16 independente da via fisiológica, tardia, relacionada e dependente da degradação de pRb por E7 do HPV, e não por fosforilação de pRb decorrente da ação do complexo ciclina D-CDK4/6 (Romagosa *et al.*, 2011).

Surge aqui então a necessidade de reflexão sobre duas importantes limitações quanto ao uso amplo de p16 nas lesões epiteliais do colo uterino associadas à infecção por HPV e precursoras do câncer cervical.

Primeira: a hiperexpressão de p16 é dependente da hiperexpressão da oncoproteína viral E7, fenômeno intimamente relacionado à integração do genoma viral e marco conceitual da neoplasia intraepitelial de graus II e III. Por sua vez, a expressão de E7 está regulada, no estágio da infecção persistente, por altos níveis intracelulares da proteína viral E2 (Howley, 2006; Cricca *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2010).

Paradoxalmente, a p16 hiperexpressa é inativa. A proteína p16 contribui para a regulação do ciclo celular por inibir o complexo ciclina D-CDK4/6. Ou seja, há proliferação celular mesmo na vigência de elevados níveis celulares de p16 (Kalof *et al.*, 2005; Romagosa *et al.*, 2011).

Segunda: a expressão de p16 no longo período da infecção persistente pelo HPV e neoplasia intraepitelial cervical de grau I é relativamente pequena, variável e controversa, quando comparada à expressão nas lesões de alto grau (NIC 2 e III).

Portanto, diante das fortes evidências atuais da relevância da infecção persistente pelo HPV para o estabelecimento de estratégias de prevenção do câncer cervical (Schiffman *et al.*, 2011), das limitações dos métodos de rastreamento e, fundamentalmente, das limitações impeditivas da aplicação da proteína p16 no diagnóstico precoce da neoplasia intraepitelial cervical, torna-se indispensável a caracterização de outros biomarcadores, como a proteína RAP1, um forte biomarcador candidato da neoplasia intraepitelial e câncer cervicais.

Desta forma, após a constatação de fortes evidências sobre alterações quantitativas e qualitativas da proteína RAP1 relacionadas às proteínas do HPV, tanto na fase da infecção persistente, por ação da proteína E2, quanto na fase tardia da NIC de alto grau, por ação da oncoproteína E6, além das alterações relacionadas ao carcinoma de células escamosas (D'silva *et al.*, 2003; Ishida *et al.*, 2003; Mitra *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2003; Chakrabarti *et al.*, 2004; Lafuente *et al.*, 2007; Frische e Zwartkruis, 2010; Smith *et al.*, 2010), inicia-se a discussão dos resultados desta tese acerca da proteína RAP1, fundamentando também sua participação na infecção cervical persistente por HPV, na progressão da neoplasia intraepitelial e no câncer do colo uterino, mesmo com toda a restrição bibliográfica sobre o tema. Em recente verificação da disponibilidade de trabalhos científicos, foram contabilizados, no período da redação desta tese, cerca de 320 trabalhos sobre RAP1 e câncer e apenas 4 estudos relacionando RAP1 e câncer cervical. Destaca-se um deste quarteto, o elegante estudo de Chakrabarti (2004), como precursor desta tese, ainda no ano de 2006.

No que se refere à imuno-histoquímica de RAP1, segundo os critérios utilizados das classificações de Klaes (2001) e Galgano (2010), os principais resultados encontrados para a proteína RAP1 são similares ao da proteína p16. Esta similaridade ocorre em praticamente todos os critérios dos grupos MND, NIC 1, NIC 2/3 e CCE, exceto quanto à intensidade das reações observadas nos grupos NIC 2/3

e CCE. Ou seja, RAP1 marca praticamente o mesmo percentual de células e tem a mesma distribuição intraepitelial de células imunorreativas que p16, embora com menor intensidade da reação em pontos específicos. Assim, os dados de RAP1 sobre o predomínio do percentual focal de células distribuídas no terço basal do epitélio presente nos grupos MND e NIC 1 contrastam com a marcação difusa de células displásicas distribuídas em toda a espessura do epitélio no grupo NIC 2/3, e, mesmo com as diferenças de intensidade da reação nas lesões de alto grau, também indicam a ruptura biológica existente entre as lesões de baixo e alto graus (Thomison *et al.*, 2008).

Do ponto de vista do melhor uso da imuno-histoquímica como método diagnóstico complementar, espera-se a maior ou mais intensa coloração da reação para caracterização da positividade ou associação com a expressão proteica. Entretanto, salienta-se que tão importante quanto a intensidade da reação para a definição da hipótese diagnóstica são as corretas e fundamentais interpretações de quais células estão imunorreativas e em qual localização tecidual se encontram. Portanto, o melhor uso da imuno-histoquímica deve favorecer a somatória dos fatores internos da reação.

Quanto à localização intracelular, a imuno-histoquímica de RAP1 também reproduz os achados de p16 e, da mesma forma que a importância recente da utilização da localização de p16 no prognóstico (Romagosa *et al.*, 2011), os resultados desta tese corroboram as primeiras publicações da translocação de RAP1 para o núcleo de Mitra (2003) e Lafuente (2007) e viabilizam amplas perspectivas de estudo dos papéis de RAP1 no núcleo de ceratinócitos na neoplasia cervical intraepitelial ou invasora.

Todos estes paralelos entre as expressões imuno-histoquímicas de RAP1 e p16 ficam mais nítidos quando se analisam as sensibilidades da imuno-histoquímica do biomarcador candidato RAP1 nos grupos MND, NIC 1 e NIC 2/3, assumindo, como referência padrão, a imunorreação do biomarcador p16. A avaliação da sensibilidade sugere bom desempenho do marcador RAP1 na identificação de MND (89,5%) e NIC 2/3 (91,4%) e ótimo desempenho na identificação de NIC 1 (98,4%). Da mesma forma, a proximidade entre as expressões imuno-histoquímicas de RAP1 e p16 é fortalecida considerando os dados sobre a quantificação da intensidade da reação imuno-histoquímica para RAP1, segundo os critérios de Furstenau (2010). Observam-se correlações positivas de todos os valores de RAP1 com todos os

valores de p16 em todos os grupos estudados e, embora não significativas estatisticamente, observa-se aumento progressivo da expressão de RAP1 com a progressão da lesão cervical. Em síntese, todos os resultados da imunohistoquímica apresentados evidenciam a equivalência entre RAP1 e p16.

Mas, diante da necessidade de maior aprofundamento nesta aparente equivalência e considerando a carência do conhecimento atual sobre as possíveis implicações de RAP1 no processo de carcinogênese cervical, foram planejadas e executadas as etapas para a quantificação do mRNA de RAP1A e RAP1B, juntamente com a quantificação do mRNA de p16 e das proteínas virais E6 e E7 dos tipos 16 e 18 de HPV por qPCR.

Porém, antes é necessário destacar a grande limitação técnica do estudo, oriunda da dificuldade de obtenção de parâmetros seguros de qualidade dos ácidos nucléicos extraídos das amostras de biópsias cervicais parafinadas. A obtenção de DNA e mRNA com boa qualidade de amostras teciduais fixadas por formalina e incluídas em parafina é um desafio experimental, com impacto direto no sucesso das reações. Embora haja completa preservação da arquitetura e das proteínas dos tecidos parafinados, a extração de ácidos nucléicos de boa qualidade para os testes moleculares pode ser dificultada pela degradação e fragmentação das moléculas de DNA e RNA, principalmente devido a interações com formalina. A fragmentação dos ácidos nucléicos influencia e limita a seleção de iniciadores e o sucesso da qPCR (Coombs *et al.*, 1999; Lehmann e Kreipe, 2001). Mesmo assim, esta parte dos testes moleculares do estudo prosseguiu, obtendo resultados muito restritos na primeira etapa, relacionada à caracterização da infecção pelo HPV por detecção do DNA viral, tipagem do HPV, quantificação absoluta da carga viral e quantificação relativa da expressão gênica de HPV 16 e HPV18. Conquanto, os resultados da extração de RNA do tecido parafinado para transcrição reversa e quantificação relativa dos genes das proteínas RAP1A, RapB e p16 foram melhores e encorajadores.

Em relação à detecção e tipagem do HPV por *Nested*-PCR do total de 319 amostras de amostras parafinadas, o DNA do HPV foi detectado em 155 biópsias (56,78%), valor pouco abaixo da média máxima de aproveitamento de 65%, quando a extração parte de amostra parafinada (HU *et. al.*, 2005). A detecção do DNA está intimamente relacionada, no material parafinado, ao tamanho dos iniciadores, dentre outros (Freitas *et al.*, 2007). A amplificação sequencial, primeiramente dos iniciadores MY09/MY11, de 450pb, seguida da amplificação do segmento interno

GP5+/GP6+, de 150 pb, aumenta a eficiência da reação (Husnjak *et al.*, 2000). Quanto aos dados da positividade para HPV nos grupos, observa-se aumento do percentual da detecção proporcional à progressão da neoplasia, similarmente ao encontrado na literatura (Xi *et al.*, 2009).

Embora a infecção pelo HPV seja considerada causa do câncer cervical, a maioria das infecções é transitória. Entretanto, a infecção persistente com HPV oncogênico é requisito para o desenvolvimento do câncer. Como a carga viral reflete a replicação viral, a quantidade de DNA pode prever o curso da infecção (Xi *et al.*, 2009). Além disso, a quantificação dos níveis de mRNA de E6 e E7 do HPV correlaciona-se com o prognóstico do carcinoma de células escamosas do colo uterino (De Boer *et al.*, 2007).

Considerando a relevância atual da determinação da carga viral e da quantidade de mRNA viral, o estudo foi planejado para a obtenção destes dados. Entretanto, após as reações de q-PCR, foi constatado número relativamente pequeno de amostras, limitando maiores inferências estatísticas, exceto a descritiva.

Retornando então à questão central deste estudo, a caracterização de RAP1 como biomarcador da neoplasia intraepitelial cervical associada à infecção pelo HPV, são apresentados os importantes resultados da expressão gênica de RAP1A e RAP1B após qPCR. As elevadas expressões relativas dos mRNA que codificam as proteínas RAP1A e RAP1B nos grupos NIC 1 e NIC 2/3, destacadamente no primeiro grupo, colocam em evidência o papel da proteína RAP1 na história natural da infecção por HPV e câncer cervical. Essa pequena GTPase semelhante a Ras pode se relacionar diretamente aos dois mais importantes momentos da infecção pelo HPV na mucosa cervical: primeiro, na infecção persistente e neoplasia intraepitelial de baixo grau, que são associadas com hiperexpressão da proteína E2; segundo na neoplasia intraepitelial cervical de alto grau, que é associada com hiperexpressão da oncoproteína E6 .

A infecção persistente pelo HPV caracteriza-se, sobretudo, por elevados níveis intracitoplasmáticos e nucleares da proteína E2. Esta importante proteína viral regula fortemente a transcrição das proteínas E6 e E7. Outra função muito importante da proteína E2 é a ancoragem do DNA episossomal viral no genoma do hospedeiro, por meio da ligação à proteína Brd4, uma proteína com papel central no controle do crescimento celular e progressão do ciclo celular (Mcbride *et al.*, 2004). A interação de E2 com Brd4 é crucial para as funções de transativação e repressão

de E2 sobre o promotor E6/E7 (McPhillips *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2010). Ligada à Brd4, a proteína E2 compete com a proteína SPA-1. Esta proteína SPA-1, por sua vez, é uma inativadora de RAP1, que tem sua atividade intensificada quando ligada à Brd4. Ou seja, a ligação da proteína E2 a Brd4 pode favorecer disfunção da proteína SPA1, criando um estado hiperativo de RAP1 no citoplasma (D'silva *et al.*, 2003; Mitra *et al.*, 2003; Farina *et al.*, 2004; McBride *et al.*, 2004; McPhillips *et al.*, 2005; Frische e Zwartkruis, 2010; Smith *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010).

Por sua vez, nas células com integração do DNA viral em seus genomas, há hiperexpressão da oncoproteína E6 do HPV. Esta proteína tem papel fundamental na degradação da proteína E6TP1, da família SPA-1. Esta degradação de E6TP1 está associada à ativação da via de sinalização MAPK e hiperexpressão com translocação nuclear de RAP1 (Singh *et al.*, 2003; Chakrabarti *et al.*, 2004).

Esse modelo de desregulação da proteína RAP1 na neoplasia intraepitelial cervical associada à infecção por HPV está representado na FIGURA 23 abaixo:

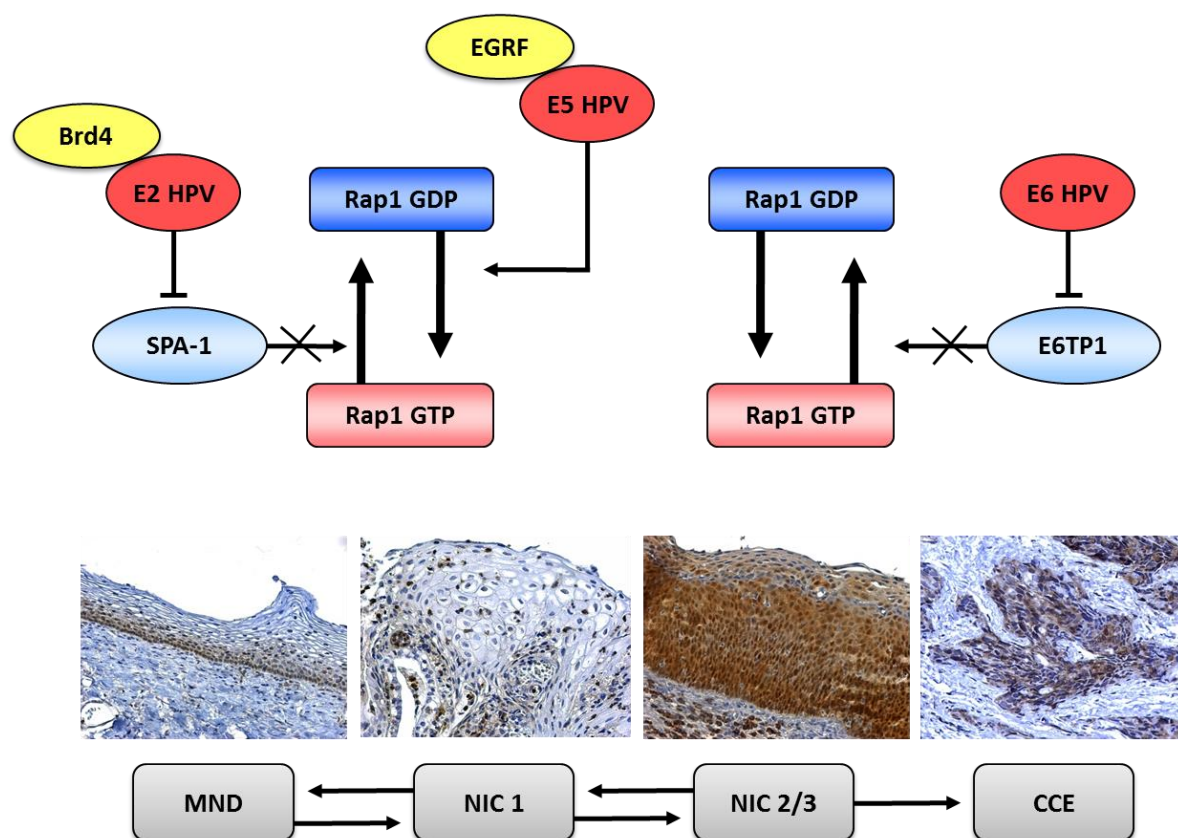


FIGURA 23 - Modelo de desregulação da proteína RAP1 na neoplasia intraepitelial cervical associada à infecção por HPV.

Assim, esta tese, além da inédita caracterização da proteína RAP1 na progressão da neoplasia intraepitelial para o câncer cervical, da ampliação do conhecimento sobre esta pequena GTPase e de suas vias no câncer, do aprofundamento sobre as interações entre as proteínas do HPV e proteínas celulares, do acréscimo da avaliação quantitativa da expressão protéica por imunohistoquímica e da aquisição de experiência quanto ao uso de técnicas moleculares em tecidos, sugere o modelo acima com os potenciais eventos progressivos de desregulação da proteína RAP1 no curso da infecção por HPV e desenvolvimento da neoplasia intraepitelial cervical em dois momentos principais, a infecção persistente por HPV associada com neoplasia intraepitelial cervical de grau I e a neoplasia intraepitelial cervical de graus II e III.

Em síntese, todos os dados deste estudo confirmam a hipótese que RAP1 é biomarcador candidato da neoplasia intraepitelial cervical associada à infecção por HPV.

6 - CONCLUSÃO

O estudo confirma a hipótese: A proteína RAP1 é um biomarcador com valor clínico potencial para a identificação e a distinção das lesões precursoras do câncer cervical NIC 1 e NIC 2/3 associadas à infecção por HPV.

A proteína RAP1 apresenta o mesmo padrão imuno-histoquímico da proteína p16 e suas duas isoformas, RAP1A e RAP1B, demonstram maior expressão gênica relativa em diferentes estágios da progressão da neoplasia intraepitelial cervical.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran-Patologia**. Elsevier Brasil, 2005. ISBN 8535213910.

ALONSO, A.; REED, J. Modelling of the human papillomavirus type 16 E5 protein. **Biochim Biophys Acta**, v. 1601, n. 1, p. 9-18, Nov 19 2002. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.

ANDERSON, J. A. Regression and ordered categorical variables. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, p. 1-30, 1984. ISSN 0035-9246.

ANTSON, A. A. et al. Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein. **Nature**, v. 403, n. 6771, p. 805-9, Feb 17 2000. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.

BASEMAN, J. G.; KOUTSKY, L. A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **J Clin Virol**, v. 32 Suppl 1, p. S16-24, Mar 2005. ISSN 1386-6532 (Print) 1386-6532.

BERNARD, H. U. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. **Antivir Ther**, v. 7, n. 4, p. 219-37, Dec 2002. ISSN 1359-6535 (Print) 1359-6535.

_____. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **J Clin Virol**, v. 32 Suppl 1, p. S1-6, Mar 2005. ISSN 1386-6532 (Print) 1386-6532.

BLACHON, S. et al. Nucleo-cytoplasmic shuttling of high risk human Papillomavirus E2 proteins induces apoptosis. **J Biol Chem**, v. 280, n. 43, p. 36088-98, Oct 28 2005. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

BODILY, J.; LAIMINS, L. A. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. **Trends Microbiol**, v. 19, n. 1, p. 33-9, Jan 2011. ISSN 0966-842x.

BOS, J. L.; DE ROOIJ, J.; REEDQUIST, K. A. RAP1 signalling: adhering to new models. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 5, p. 369-77, May 2001. ISSN 1471-0072 (Print) 1471-0072.

BRENNA, S. M. F.; SYRJÄNEN, K. J. Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. **São Paulo Medical Journal**, v. 121, n. 3, p. 128-132, 2003. ISSN 1516-3180.

BRUMMER, O. et al. Human papillomavirus-type persistence patterns predict the clinical outcome of cervical intraepithelial neoplasia. **Gynecol Oncol**, v. 102, n. 3, p. 517-22, Sep 2006. ISSN 0090-8258 (Print)
0090-8258.

BURCHELL, A. N. et al. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, p. S3/52-61, Aug 31 2006. ISSN 0264-410X (Print)
0264-410x.

BURD, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 1, p. 1-17, Jan 2003. ISSN 0893-8512 (Print)
0893-8512.

CAETANO, R. et al. Custo-efetividade no diagnóstico precoce do câncer de colo uterino no Brasil. **Physis (Rio J.)**, v. 16, n. 1, p. 99-118, 2006. ISSN 0103-7331.

CARVALHO, M. et al. Human papillomavirus infection in Rio de Janeiro, Brazil: a retrospective study. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 398-404, 2005. ISSN 1413-8670.

CASTELLSAGUE, X.; MUNOZ, N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. **J Natl Cancer Inst Monogr**, n. 31, p. 20-8, 2003. ISSN 1052-6773 (Print)
1052-6773.

CASTLE, P. E.; GIULIANO, A. R. Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients--assessing their roles as human papillomavirus cofactors. **J Natl Cancer Inst Monogr**, n. 31, p. 29-34, 2003. ISSN 1052-6773 (Print)
1052-6773.

CATTANI, P. et al. RNA (E6 and E7) assays versus DNA (E6 and E7) assays for risk evaluation for women infected with human papillomavirus. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 7, p. 2136-41, Jul 2009. ISSN 0095-1137.

CAVALCANTI, S. M. et al. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. **Journal of Infection**, v. 40, n. 1, p. 80-87, 2000. ISSN 0163-4453.

CHAKRABARTI, O.; KRISHNA, S. Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. **J Biosci**, v. 28, n. 3, p. 337-48, Apr 2003. ISSN 0250-5991 (Print)
0250-5991.

CHAKRABARTI, O. et al. Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic Ras. **J Virol**, v. 78, n. 11, p. 5934-45, Jun 2004. ISSN 0022-538X (Print)
0022-538x.

CHOW, L. T.; BROKER, T. R.; STEINBERG, B. M. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. **Apmis**, v. 118, n. 6-7, p. 422-49, Jun 2010. ISSN 0903-4641.

CICERO, D. O. et al. Structural and thermodynamic basis for the enhanced transcriptional control by the human papillomavirus strain-16 E2 protein. **Biochemistry**, v. 45, n. 21, p. 6551-60, May 30 2006. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960.

CICINNATI, V. R. et al. Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. **BMC Cancer**, v. 8, p. 350, 2008. ISSN 1471-2407.

CLOWER, R. V.; HU, Y.; MELENDY, T. Papillomavirus E2 protein interacts with and stimulates human topoisomerase I. **Virology**, v. 348, n. 1, p. 13-8, Apr 25 2006. ISSN 0042-6822 (Print) 0042-6822.

COLLINS, A. S. et al. Interactions with pocket proteins contribute to the role of human papillomavirus type 16 E7 in the papillomavirus life cycle. **J Virol**, v. 79, n. 23, p. 14769-80, Dec 2005. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

COOMBS, N. J.; GOUGH, A. C.; PRIMROSE, J. N. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. **Nucleic Acids Res**, v. 27, n. 16, p. e12, Aug 15 1999. ISSN 0305-1048.

CRICCA, M. et al. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. **Gynecol Oncol**, v. 106, n. 3, p. 549-57, Sep 2007. ISSN 0090-8258 (Print) 0090-8258.

CROTHERS, B. A. The Bethesda System 2001: update on terminology and application. **Clin Obstet Gynecol**, v. 48, n. 1, p. 98-107, Mar 2005. ISSN 0009-9201 (Print) 0009-9201.

CRUM, C. P. Symposium part 1: Should the Bethesda System terminology be used in diagnostic surgical pathology?: Point. **Int J Gynecol Pathol**, v. 22, n. 1, p. 5-12, Jan 2003. ISSN 0277-1691 (Print) 0277-1691.

CRUSIUS, K.; RODRIGUEZ, I.; ALONSO, A. The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes. **Virus Genes**, v. 20, n. 1, p. 65-9, 2000. ISSN 0920-8569 (Print) 0920-8569.

CUBILLA, A. L. et al. Value of p16(INK)(4)(a) in the pathology of invasive penile squamous cell carcinomas: A report of 202 cases. **Am J Surg Pathol**, v. 35, n. 2, p. 253-61, Feb 2011. ISSN 0147-5185.

CUSCHIERI, K.; WENTZENSEN, N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 17, n. 10, p. 2536-45, Oct 2008. ISSN 1055-9965 (Print) 1055-9965.

D'OTTAVIANO-MORELLI, M. G. L. et al. Prevalence of cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma based on cytological screening in the region of Campinas, São Paulo, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 153-159, 2004. ISSN 0102-311X.

D'SILVA, N. J. et al. RAP1, a small GTP-binding protein is upregulated during arrest of proliferation in human keratinocytes. **J Cell Physiol**, v. 196, n. 3, p. 532-40, Sep 2003. ISSN 0021-9541 (Print) 0021-9541.

DE BOER, M. A. et al. High human papillomavirus oncogene mRNA expression and not viral DNA load is associated with poor prognosis in cervical cancer patients. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 1, p. 132-8, Jan 1 2007. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432.

DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, Jun 20 2004. ISSN 0042-6822 (Print) 0042-6822.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **J Clin Virol**, v. 32 Suppl 1, p. S7-15, Mar 2005. ISSN 1386-6532 (Print) 1386-6532.

DUNNE, E. F.; MARKOWITZ, L. E. Genital human papillomavirus infection. **Clin Infect Dis**, v. 43, n. 5, p. 624-9, Sep 1 2006. ISSN 1058-4838.

ESTIMATIVA, I. Incidência de câncer no Brasil. **V (1)**, p. 9-37, 2010.

FARINA, A. et al. 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, Oct 2004. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306.

FERENCZY, A.; FRANCO, E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. **Lancet Oncol**, v. 3, n. 1, p. 11-6, Jan 2002. ISSN 1470-2045 (Print) 1470-2045.

FISCHER, C. A. et al. p16 expression in oropharyngeal cancer: its impact on staging and prognosis compared with the conventional clinical staging parameters. **Ann Oncol**, v. 21, n. 10, p. 1961-6, Oct 2010. ISSN 0923-7534.

FLORIN, L. et al. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. **J Virol**, v. 76, n. 19, p. 10009-14, Oct 2002. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

FREITAS, T. P. et al. Molecular detection of HPV 16 and 18 in cervical samples of patients from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 5, p. 297-301, 2007. ISSN 0036-4665.

FRISCHE, E. W.; ZWARTKRUIS, F. J. RAP1, a mercenary among the Ras-like GTPases. **Dev Biol**, v. 340, n. 1, p. 1-9, Apr 1 2010. ISSN 0012-1606.

FURSTENAU, D. K. et al. Ras-related protein 1 and the insulin-like growth factor type I receptor are associated with risk of progression in patients diagnosed with carcinoma in situ. **Breast Cancer Res Treat**, v. 129, n. 2, p. 361-72, Sep 2011. ISSN 0167-6806.

GALGANO, M. T. et al. Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. **Am J Surg Pathol**, v. 34, n. 8, p. 1077-87, Aug 2010. ISSN 0147-5185.

GAMMOH, N. et al. Regulation of human papillomavirus type 16 E7 activity through direct protein interaction with the E2 transcriptional activator. **J Virol**, v. 80, n. 4, p. 1787-97, Feb 2006. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

GENTHER, S. M. et al. Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. **J Virol**, v. 77, n. 5, p. 2832-42, Mar 2003. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

GRAHAM, S. V. Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. **Future Microbiol**, v. 5, n. 10, p. 1493-506, Oct 2010. ISSN 1746-0913.

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, Jun 2005. ISSN 0891-5520 (Print) 0891-5520.

HATTORI, M.; MINATO, N. RAP1 GTPase: functions, regulation, and malignancy. **J Biochem**, v. 134, n. 4, p. 479-84, Oct 2003. ISSN 0021-924X (Print) 0021-924x.

HAWS, A. L. F. et al. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5+/6+ primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. **Journal of virological methods**, v. 122, n. 1, p. 87-93, 2004. ISSN 0166-0934.

HEGDE, R. S. The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, v. 31, p. 343-60, 2002. ISSN 1056-8700 (Print) 1056-8700.

HIRATA, T. et al. Amplification, up-regulation and over-expression of C3G (CRK SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor) in non-small cell lung cancers. **J Hum Genet**, v. 49, n. 6, p. 290-5, 2004. ISSN 1434-5161 (Print) 1434-5161.

HOOLEY, E. et al. The recognition of local DNA conformation by the human papillomavirus type 6 E2 protein. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. 14, p. 3897-908, 2006. ISSN 0305-1048.

HOSMER JR, D. W.; LEMESHOW, S.; STURDIVANT, R. X. **Applied logistic regression**. John Wiley & Sons, 2013. ISBN 0470582472.

HOWLEY, P. M. Warts, cancer and ubiquitylation: lessons from the papillomaviruses. **Trans Am Clin Climatol Assoc**, v. 117, p. 113-26; discussion 126-7, 2006. ISSN 0065-7778 (Print) 0065-7778.

HU, L. et al. Human papillomavirus genotyping and p16INK4a expression in cervical intraepithelial neoplasia of adolescents. **Mod Pathol**, v. 18, n. 2, p. 267-73, Feb 2005. ISSN 0893-3952 (Print) 0893-3952.

HUSNJAK, K. et al. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. **J Virol Methods**, v. 88, n. 2, p. 125-34, Aug 2000. ISSN 0166-0934 (Print) 0166-0934.

ISHIDA, D. et al. Myeloproliferative stem cell disorders by deregulated RAP1 activation in SPA-1-deficient mice. **Cancer Cell**, v. 4, n. 1, p. 55-65, Jul 2003. ISSN 1535-6108 (Print) 1535-6108.

JORDÃO, B.; ANDRADE, C. Ciclo celular e meiose. **Junqueira LC & Carneiro J. Biologia Celular e Molecular**. 7ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan, p. 171-97, 2000.

KALOF, A. N.; COOPER, K. p16INK4a immunoexpression: surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Adv Anat Pathol**, v. 13, n. 4, p. 190-4, Jul 2006. ISSN 1072-4109 (Print) 1072-4109.

KALOF, A. N. et al. p16INK4A immunoexpression and HPV in situ hybridization signal patterns: potential markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Am J Surg Pathol**, v. 29, n. 5, p. 674-9, May 2005. ISSN 0147-5185 (Print) 0147-5185.

KLAES, R. et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. **Am J Surg Pathol**, v. 26, n. 11, p. 1389-99, Nov 2002. ISSN 0147-5185 (Print)

0147-5185.

KLAES, R. et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. **Int J Cancer**, v. 92, n. 2, p. 276-84, Apr 15 2001. ISSN 0020-7136 (Print) 0020-7136.

KNIPE, D. et al. Fields virology, vol. 1. **Philadelphia (EUA): Lippincott Williams & Wilkins**, 2001.

KOMETANI, K. et al. RAP1 and SPA-1 in hematologic malignancy. **Trends Mol Med**, v. 10, n. 8, p. 401-8, Aug 2004. ISSN 1471-4914 (Print) 1471-4914.

LAFUENTE, E. M. et al. Active RAP1, a small GTPase that induces malignant transformation of hematopoietic progenitors, localizes in the nucleus and regulates protein expression. **Leuk Lymphoma**, v. 48, n. 5, p. 987-1002, May 2007. ISSN 1042-8194 (Print) 1026-8022.

LASSEN, P. et al. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 12, p. 1992-8, Apr 20 2009. ISSN 0732-183x.

LEE, C.; LAIMINS, L. A. Role of the PDZ domain-binding motif of the oncoprotein E6 in the pathogenesis of human papillomavirus type 31. **J Virol**, v. 78, n. 22, p. 12366-77, Nov 2004. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

LEE, C.; WOOLDRIDGE, T. R.; LAIMINS, L. A. Analysis of the roles of E6 binding to E6TP1 and nuclear localization in the human papillomavirus type 31 life cycle. **Virology**, v. 358, n. 1, p. 201-10, Feb 5 2007. ISSN 0042-6822 (Print) 0042-6822.

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, Dec 2001. ISSN 1046-2023 (Print) 1046-2023.

LIAO, Y. et al. RA-GEF, a novel RAP1A guanine nucleotide exchange factor containing a Ras/RAP1A-associating domain, is conserved between nematode and humans. **J Biol Chem**, v. 274, n. 53, p. 37815-20, Dec 31 1999. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

LINHARES, A. C.; VILLA, L. L. Vaccines against rotavirus and human papillomavirus (HPV). **Jornal de pediatria**, v. 82, n. 3, p. s25-s34, 2006. ISSN 0021-7557.

LIU, X. et al. Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. **J Biol Chem**, v. 281, n. 1, p. 578-86, Jan 6 2006. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023 (Print) 1046-2023.

LORENZATO, M. et al. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? **Hum Pathol**, v. 36, n. 10, p. 1101-7, Oct 2005. ISSN 0046-8177 (Print) 0046-8177.

LOZANO, R. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095-128, Dec 15 2012. ISSN 0140-6736.

MCBRIDE, A. A.; MCPHILLIPS, M. G.; OLIVEIRA, J. G. Brd4: tethering, segregation and beyond. **Trends Microbiol**, v. 12, n. 12, p. 527-9, Dec 2004. ISSN 0966-842X (Print) 0966-842x.

MCMURRAY, H. R.; MCCANCE, D. J. Degradation of p53, not telomerase activation, by E6 is required for bypass of crisis and immortalization by human papillomavirus type 16 E6/E7. **J Virol**, v. 78, n. 11, p. 5698-706, Jun 2004. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

MCMURRAY, H. R. et al. Biology of human papillomaviruses. **Int J Exp Pathol**, v. 82, n. 1, p. 15-33, Feb 2001. ISSN 0959-9673 (Print) 0959-9673.

MCPHILLIPS, M. G.; OZATO, K.; MCBRIDE, A. A. Interaction of bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 stabilizes its association with chromatin. **J Virol**, v. 79, n. 14, p. 8920-32, Jul 2005. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

MEISELS, A.; FORTIN, R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. **Acta Cytol**, v. 20, n. 6, p. 505-9, Nov-Dec 1976. ISSN 0001-5547 (Print) 0001-5547.

MIDDLETON, K. et al. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. **J Virol**, v. 77, n. 19, p. 10186-201, Oct 2003. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

MILDE-LANGOSCH, K.; RIETHDORF, S. Role of cell-cycle regulatory proteins in gynecological cancer. **J Cell Physiol**, v. 196, n. 2, p. 224-44, Aug 2003. ISSN 0021-9541 (Print)
0021-9541.

MITRA, R. S. et al. RAP1A and RAP1B ras-family proteins are prominently expressed in the nucleus of squamous carcinomas: nuclear translocation of GTP-bound active form. **Oncogene**, v. 22, n. 40, p. 6243-56, Sep 18 2003. ISSN 0950-9232 (Print)
0950-9232.

MOSCICKI, A. B. et al. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, p. S3/42-51, Aug 31 2006. ISSN 0264-410X (Print)
0264-410x.

MOUNT, S. L. et al. Human Papillomavirus-Induced Lesions of the Cervix: A Review and Update on the Grading of Cervical Dysplasia. **Pathology Case Reviews**, v. 8, n. 4, p. 145-151, 2003. ISSN 1082-9784.

MUNOZ, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, v. 348, n. 6, p. 518-27, Feb 6 2003. ISSN 0028-4793.

MUNOZ, N. et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, p. S3/1-10, Aug 31 2006. ISSN 0264-410X (Print)
0264-410x.

MURPHY, N. et al. p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. **J Clin Pathol**, v. 58, n. 5, p. 525-34, May 2005. ISSN 0021-9746 (Print)
0021-9746.

NARAHARI, J. et al. Interactions of the cellular CCAAT displacement protein and human papillomavirus E2 protein with the viral origin of replication can regulate DNA replication. **Virology**, v. 350, n. 2, p. 302-11, Jul 5 2006. ISSN 0042-6822 (Print)
0042-6822.

NELLORE, A. et al. Loss of RAP1GAP in papillary thyroid cancer. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 3, p. 1026-32, Mar 2009. ISSN 0021-972x.

NOMINE, Y. et al. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. **Mol Cell**, v. 21, n. 5, p. 665-78, Mar 3 2006. ISSN 1097-2765 (Print)
1097-2765.

OLIVEIRA, J. G.; COLF, L. A.; MCBRIDE, A. A. Variations in the association of papillomavirus E2 proteins with mitotic chromosomes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 4, p. 1047-52, Jan 24 2006. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424.

PEITSARO, P.; JOHANSSON, B.; SYRJANEN, S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 3, p. 886-91, Mar 2002. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137.

PINHO, A. D. A. et al. Cobertura e motivos para a realização ou não do teste de Papanicolaou no Município de São Paulo. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. S303-S313, 2003. ISSN 0102-311X.

RHO, H. W. et al. Identification of valid reference genes for gene expression studies of human stomach cancer by reverse transcription-qPCR. **BMC Cancer**, v. 10, p. 240, 2010. ISSN 1471-2407.

ROMAGOSA, C. et al. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. **Oncogene**, v. 30, n. 18, p. 2087-97, May 5 2011. ISSN 0950-9232.

ROSAI, J. **Rosai and Ackerman's Surgical Pathology 10e**. Elsevier Health Sciences, 2011. ISBN 032308804X.

SANCLEMENTE, G.; GILL, D. K. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 16, n. 3, p. 231-40, May 2002. ISSN 0926-9959 (Print) 0926-9959.

SANTIN, A. D. et al. Gene expression profiles of primary HPV16- and HPV18-infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy. **Virology**, v. 331, n. 2, p. 269-91, Jan 20 2005. ISSN 0042-6822 (Print) 0042-6822.

SANTOPIETRO, R. et al. Cell cycle regulators p105, p107, Rb2/p130, E2F4, p21CIP1/WAF1, cyclin A in predicting cervical intraepithelial neoplasia, high-risk human papillomavirus infections and their outcome in women screened in three new independent states of the former Soviet Union. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 15, n. 7, p. 1250-6, Jul 2006. ISSN 1055-9965 (Print) 1055-9965.

SCHEFE, J. H. et al. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. **J Mol Med (Berl)**, v. 84, n. 11, p. 901-10, Nov 2006. ISSN 0946-2716 (Print) 0946-2716.

SCHEURER, M. E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. **Int J Gynecol Cancer**, v. 15, n. 5, p. 727-46, Sep-Oct 2005. ISSN 1048-891X (Print) 1048-891x.

SCHIFFMAN, M. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**, v. 370, n. 9590, p. 890-907, Sep 8 2007. ISSN 0140-6736.

SCHIFFMAN, M.; KJAER, S. K. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. **J Natl Cancer Inst Monogr**, n. 31, p. 14-9, 2003. ISSN 1052-6773 (Print)
1052-6773.

SCHIFFMAN, M. et al. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 103, n. 5, p. 368-83, Mar 2 2011. ISSN 0027-8874.

SCHNEIDER, V. CIN prognostication: will molecular techniques do the trick? **Acta Cytol**, v. 47, n. 2, p. 115-6, Mar-Apr 2003. ISSN 0001-5547 (Print)
0001-5547.

SHI, S. R.; LIU, C.; TAYLOR, C. R. Standardization of immunohistochemistry for formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen-retrieval technique: from experiments to hypothesis. **J Histochem Cytochem**, v. 55, n. 2, p. 105-9, Feb 2007. ISSN 0022-1554 (Print)
0022-1554.

SHI, S. R.; SHI, Y.; TAYLOR, C. R. Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. **J Histochem Cytochem**, v. 59, n. 1, p. 13-32, Jan 2011. ISSN 0022-1554.

SINGH, L. et al. The high-risk human papillomavirus type 16 E6 counters the GAP function of E6TP1 toward small Rap G proteins. **J Virol**, v. 77, n. 2, p. 1614-20, Jan 2003. ISSN 0022-538X (Print)
0022-538x.

SMITH, J. A. et al. Genome-wide siRNA screen identifies SMCX, EP400, and Brd4 as E2-dependent regulators of human papillomavirus oncogene expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 8, p. 3752-7, Feb 23 2010. ISSN 0027-8424.

SONG, S. H. et al. Risk factors for the progression or persistence of untreated mild dysplasia of the uterine cervix. **Int J Gynecol Cancer**, v. 16, n. 4, p. 1608-13, Jul-Aug 2006. ISSN 1048-891X (Print)
1048-891x.

STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine**, v. 24 Suppl 1, p. S16-22, Mar 30 2006. ISSN 0264-410X (Print)
0264-410x.

_____. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. **Gynecol Oncol**, v. 117, n. 2 Suppl, p. S5-10, May 2010. ISSN 0090-8258.

STANLEY, M. A. Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 15, n. 5, p. 663-76, Oct 2001. ISSN 1521-6934 (Print)
1521-6934.

STOLER, M. H. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia: implications for diagnostic criteria and testing. **Arch Pathol Lab Med**, v. 127, n. 8, p. 935-9, Aug 2003. ISSN 0003-9985.

THOMISON, J., 3RD; THOMAS, L. K.; SHROYER, K. R. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. **Hum Pathol**, v. 39, n. 2, p. 154-66, Feb 2008. ISSN 0046-8177 (Print) 0046-8177.

TINDLE, R. W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 1, p. 59-65, Jan 2002. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175x.

TROTTIER, H.; FRANCO, E. L. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Vaccine**, v. 24 Suppl 1, p. S1-15, Mar 30 2006. ISSN 0264-410X (Print) 0264-410x.

TSAI, T. C.; CHEN, S. L. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. **Arch Virol**, v. 148, n. 8, p. 1445-53, Aug 2003. ISSN 0304-8608 (Print) 0304-8608.

TSOUMPOU, I. et al. p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. **Cancer Treat Rev**, v. 35, n. 3, p. 210-20, May 2009. ISSN 0305-7372.

VON KNEBEL DOEBERITZ, M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. **Eur J Cancer**, v. 38, n. 17, p. 2229-42, Nov 2002. ISSN 0959-8049 (Print) 0959-8049.

WALTS, A. E.; BOSE, S. p16, Ki-67, and BD ProExC immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. **Hum Pathol**, v. 40, n. 7, p. 957-64, Jul 2009. ISSN 0046-8177.

WANG, S. S.; HILDESHEIM, A. Chapter 5: Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. **J Natl Cancer Inst Monogr**, n. 31, p. 35-40, 2003. ISSN 1052-6773 (Print) 1052-6773.

WILSON, V. G. et al. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. **Virus Genes**, v. 24, n. 3, p. 275-90, Jun 2002. ISSN 0920-8569 (Print) 0920-8569.

WOODWORTH, C. D. HPV innate immunity. **Front Biosci**, v. 7, p. d2058-71, Oct 1 2002. ISSN 1093-9946 (Print) 1093-4715 (Linking).

XI, L. F. et al. Relationship between cigarette smoking and human papilloma virus types 16 and 18 DNA load. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 18, n. 12, p. 3490-6, Dec 2009. ISSN 1055-9965.

XUE, Y. et al. HPV16 E2 is an immediate early marker of viral infection, preceding E7 expression in precursor structures of cervical carcinoma. **Cancer Res**, v. 70, n. 13, p. 5316-25, Jul 1 2010. ISSN 0008-5472.

YAN, J. et al. Abrogation of the Brd4-positive transcription elongation factor B complex by papillomavirus E2 protein contributes to viral oncogene repression. **J Virol**, v. 84, n. 1, p. 76-87, Jan 2010. ISSN 0022-538x.

YOU, J. Papillomavirus interaction with cellular chromatin. **Biochim Biophys Acta**, v. 1799, n. 3-4, p. 192-9, Mar-Apr 2010. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.

ZEHBE, I.; WILANDER, E. Two consensus primer systems and nested polymerase chain reaction for human papillomavirus detection in cervical biopsies: A study of sensitivity. **Hum Pathol**, v. 27, n. 8, p. 812-5, Aug 1996. ISSN 0046-8177 (Print) 0046-8177.

ZHANG, Z. et al. RAP1GAP inhibits tumor growth in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Am J Pathol**, v. 168, n. 2, p. 585-96, Feb 2006. ISSN 0002-9440 (Print) 0002-9440.

ZHENG, H. et al. Down-regulation of RAP1GAP via promoter hypermethylation promotes melanoma cell proliferation, survival, and migration. **Cancer Res**, v. 69, n. 2, p. 449-57, Jan 15 2009. ISSN 0008-5472.

ZHENG, Z. M.; BAKER, C. C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **Front Biosci**, v. 11, p. 2286-302, 2006. ISSN 1093-9946 (Print) 1093-4715.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342-50, May 2002. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175x.

ANEXOS

ANEXO 1: Comprovante CEP - CONEP

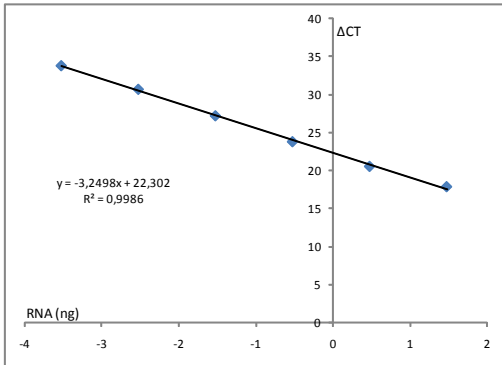
Andamento do projeto - CAAE - 0397.0.203.245-09				
Título do Projeto de Pesquisa				
EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS CELULARES INDUZIDAS POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO DE ALTO RISCO COMO BIOMARCADORES DA NEOPLÁSIA EPITELIAL CERVICAL				
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	28/08/2009 09:40:33	07/10/2009 16:21:49		
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	28/08/2009 09:40:33	Folha de Rosto	0397.0.203.245-09	CEP
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	26/08/2009 09:20:24	Folha de Rosto	FR.286284	Pesquisador
3 - Protocolo Pendente no CEP	17/09/2009 12:06:06	Folha de Rosto	397/09	CEP
4 - Protocolo Aprovado no CEP	07/10/2009 16:21:49	Folha de Rosto	397/09	CEP

ANEXO 2: Eficiências das qPCR dos alvos celulares

Eficiência Beta actina

RNA (ng)	ΔCT
1,48	17,83
0,48	20,51
-0,52	23,77
-1,52	27,18
-2,52	30,68
-3,52	33,79

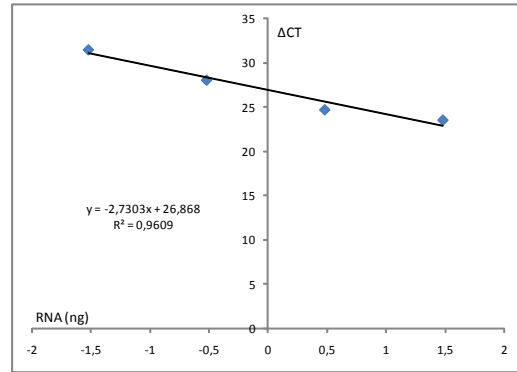
Eficiência $10^{A^{-1}/slope} + 1$
0,97



Eficiência Rap1A

RNA (ng)	ΔCT
1,48	23,51
0,48	24,68
-0,52	28,04
-1,52	31,49

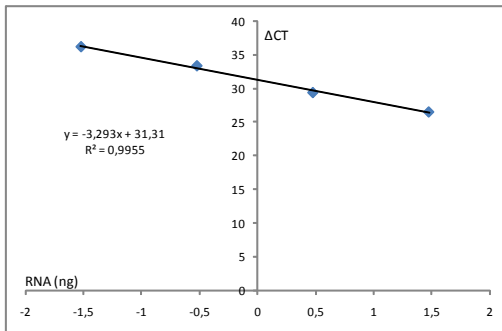
Eficiência $10^{A^{-1}/slope} + 1$
0,96



Eficiência p16

RNA (ng)	ΔCT
1,48	26,55
0,48	29,42
-0,52	33,38
-1,52	36,20

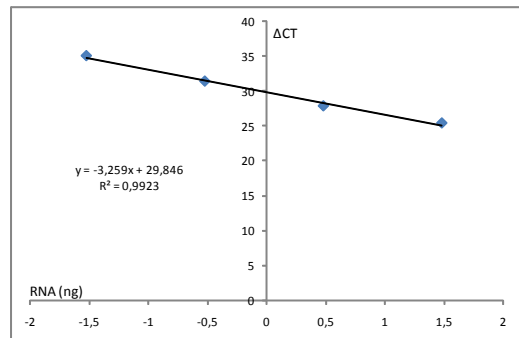
Eficiência $10^{A^{-1}/slope} + 1$
0,97



Eficiência Rap1B

RNA (ng)	ΔCT
1,48	25,38
0,48	27,84
-0,52	31,40
-1,52	35,06

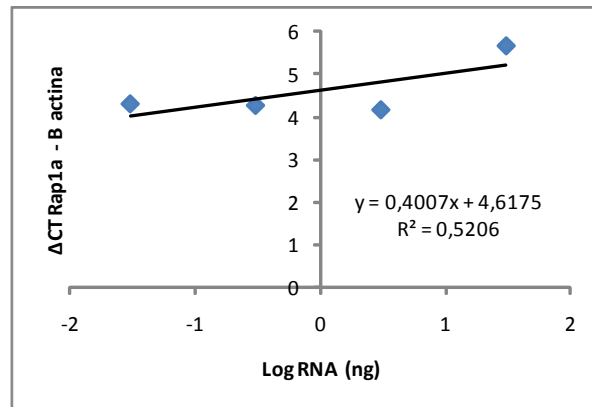
Eficiência $10^{A^{-1}/slope} + 1$
0,97



ANEXO 3: Validação para cálculo Delta-Delta CT ($\Delta\Delta CT$)

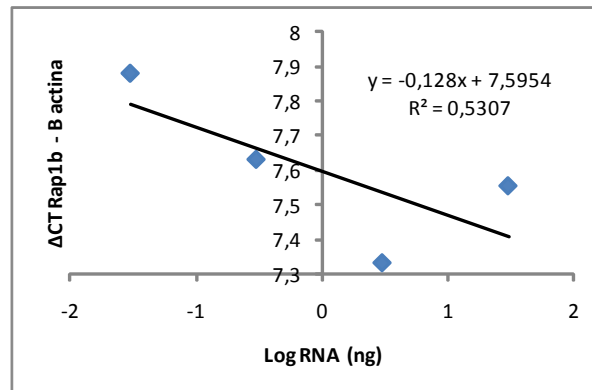
Rap1 a	ΔCT Rap1a - B actina
Log RNA (ng)	
1,48	5,68
0,48	4,17
-0,52	4,27
-1,52	4,31

Diferença $\Delta CT < 2$
Slope do $\Delta CT = 0,4$



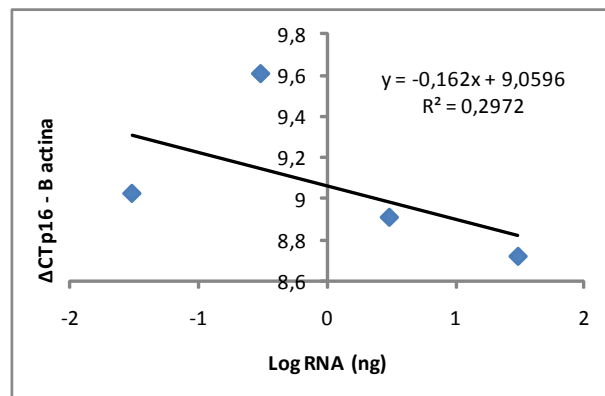
Rap1 b	ΔCT Rap1b - B actina
Log RNA (ng)	
1,48	7,55
0,48	7,33
-0,52	7,63
-1,52	7,88

Diferença $\Delta CT < 1$
Slope do $\Delta CT = 0,1$



p16	ΔCT p16 - B actina
Log RNA (ng)	
1,48	8,72
0,48	8,91
-0,52	9,61
-1,52	9,02

Diferença $\Delta CT < 1$
Slope do $\Delta CT = 0,1$

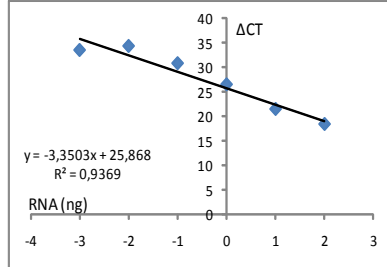


ANEXO 4: Eficiências das qPCR dos alvos virais (DNA)

Curva padrão com DNA HPV16 e HPV18

Beta actina

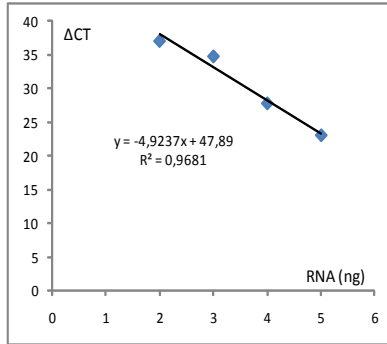
RNA (ng)	Log	CT
100	2	18,53
10	1	21,57
1	0	26,54
0,1	-1	30,82
0,01	-2	34,31
0,001	-3	33,49



Eficiência $10^{1/\text{slope}} + 1$
0,96

E6 16

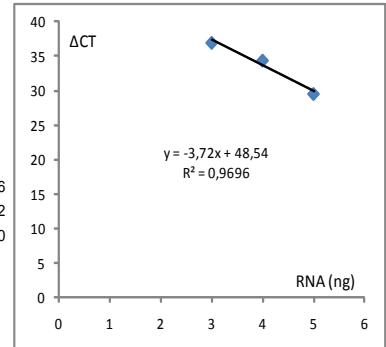
Cópias HPV/ng de DNA celular	Log	Ct médio
1000000	6	6
100000	5	23,00
10000	4	27,76
1000	3	34,79
100	2	37,07
10	1	



Eficiência $10^{1/\text{slope}} + 1$
0,97

E6 18

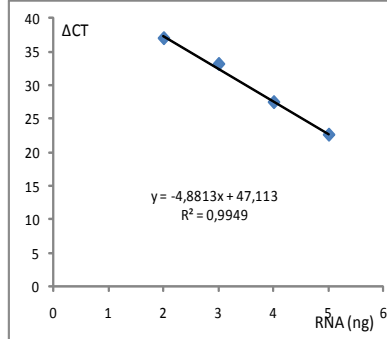
Cópias HPV/ng de DNA celular	Log	Ct médio
1000000	6,0	6,0
100000	5,0	29,56
10000	4,0	34,42
1000	3,0	37,00
100	2,0	
10	1,0	



Eficiência $10^{1/\text{slope}} + 1$
0,97

E7 16

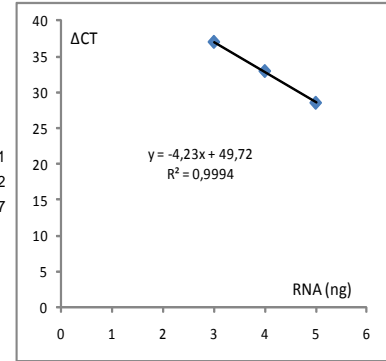
Cópias HPV/ng de DNA celular	Log	Ct médio
1000000	6	6
100000	5	22,59
10000	4	27,44
1000	3	33,12
100	2	36,96
10	1	



Eficiência $10^{1/\text{slope}} + 1$
0,97

E7 18

Cópias HPV/ng de DNA celular	Log	Ct médio
1000000	6,0	6,0
100000	5,0	28,51
10000	4,0	32,92
1000	3,0	36,97
100	2,0	
10	1,0	



Eficiência $10^{1/\text{slope}} + 1$
0,97

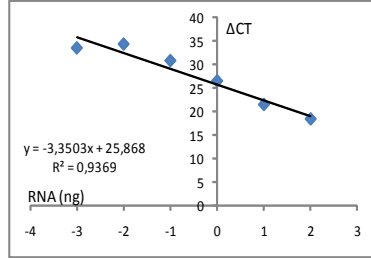
ANEXO 5: Eficiências das qPCR dos alvos virais (cDNA)

Curva padrão com cDNA HPV16 e HPV18

Beta actina

RNA (ng)	Log	CT
100	2	18,53
10	1	21,57
1	0	26,54
0,1	-1	30,82
0,01	-2	34,31
0,001	-3	33,49

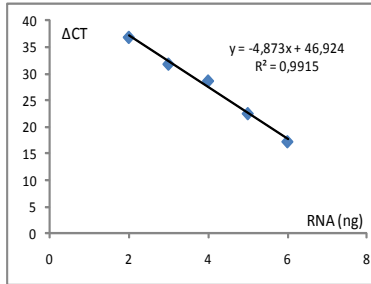
Eficiência $10^{-1/\text{slope}} + 1$
0,96



E6 16

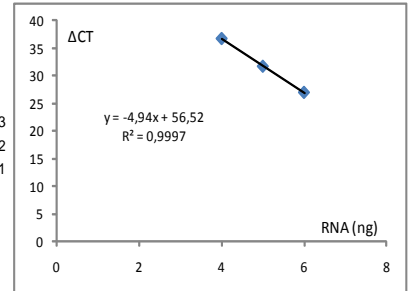
Cópias HPV/ng de DNA celular	Log	Ct médio
1000000	6,0	17,21
100000	5,0	22,52
10000	4,0	28,67
1000	3,0	31,85
100	2,0	36,91
10	1,0	

Eficiência $10^{-1/\text{slope}} + 1$
0,98



E6 18 ΔCT

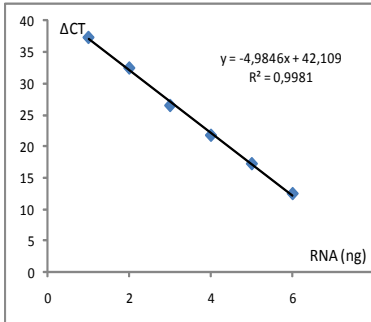
Cópias HPV/ng de DNA celular	Log	Ct médio
1000000	6,0	26,93
100000	5,0	31,72
10000	4,0	36,81
1000	3,0	
100	2,0	
10	1,0	



E716

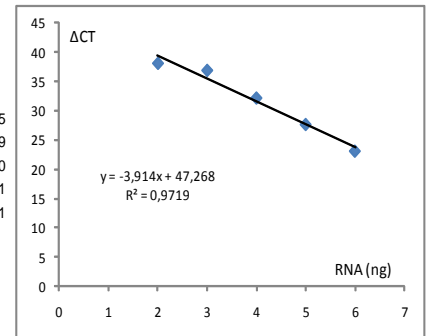
Cópias HPV/ng de DNA celular	Log	Ct médio
1000000	6,0	12,53
100000	5,0	17,28
10000	4,0	21,80
1000	3,0	26,53
100	2,0	32,49
10	1,0	37,35

Eficiência $10^{-1/\text{slope}} + 1$
0,98



E718

Cópias HPV/ng de DNA celular	Log	Ct médio
1000000	6,0	23,15
100000	5,0	27,69
10000	4,0	32,20
1000	3,0	36,91
100	2,0	38,11
10	1,0	



ARTIGO ORIGINAL

PASCOAL-XAVIER, M. A. et al. RAP1 GTPase overexpression is associated with cervical intraepithelial neoplasia. **PLoS One**, v. 10(4), e0123531, Apr 2015. doi:10.1371/journal.pone.0123531.

RESEARCH ARTICLE

RAP1 GTPase Overexpression is Associated with Cervical Intraepithelial Neoplasia

Marcelo Antonio Pascoal-Xavier^{1*}, Ana Carolina Cançado Figueiredo², Luciana Inácia Gomes², Vanessa Peruhype-Magalhães², Carlos Eduardo Calzavara-Silva², Marcelo Azevedo Costa³, Ilka Afonso Reis⁴, Claudio Antônio Bonjardim¹, Erna Geessien Kroon¹, Jaqueline G. de Oliveira^{2,4*}, Paulo César Peregrino Ferreira^{1,4†}

1 Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, **2** Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Belo Horizonte Minas Gerais, Brasil, **3** Departamento de Engenharia de Produção, Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, **4** Departamento de Estatística, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil



* These authors contributed equally to this work.

† Current address: Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

‡ These authors are senior authors on this work.

* jaque@cpqrr.fiocruz.br

OPEN ACCESS

Citation: Pascoal-Xavier MA, Figueiredo ACC, Gomes LI, Peruhype-Magalhães V, Calzavara-Silva CE, Costa MA, et al. (2015) RAP1 GTPase Overexpression is Associated with Cervical Intraepithelial Neoplasia. PLoS ONE 10(4): e0123531. doi:10.1371/journal.pone.0123531

Academic Editor: Javier S Castresana, University of Navarra, SPAIN

Received: October 15, 2014

Accepted: February 19, 2015

Published: April 9, 2015

Copyright: © 2015 Pascoal-Xavier et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This research was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-www.cnpq.br), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES — www.capes.gov.br), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - www.fapemig.br). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

RAP1 (RAS proximate 1), a small GTP-binding protein of the RAS superfamily, is a putative oncogene that is highly expressed in several malignant cell lines and types of cancers, including some types of squamous cell carcinoma. However, the participation of RAP1 in cervical carcinogenesis is unknown. We conducted a cross-sectional study of paraffin-embedded cervical biopsies to determine the association of RAP1 with cervical intraepithelial neoplasia (CIN). Standard and quantitative immunohistochemistry assessment of RAP1 expression in fixed tissue was performed on 183 paraffin-embedded cervical biopsies that were classified as normal or non-dysplastic mucosa (NDM) (n = 33); CIN grade 1 (n = 84) and CIN grade 2/3 (n = 66). A gradual increase in RAP1 expression in NDM < CIN 1 < CIN 2/3 (p < 0.001) specimens was observed and was in agreement with the histopathologic diagnosis. A progressive increase in the RAP1 expression levels increased the risk of CIN 1 [odds ratio (OR) = 3.50; 95% confidence interval (CI) 1.30-10.64] 3.5 fold and the risk of CIN 2/3 (OR = 19.86, 95% CI 6.40-70.79) nearly 20 fold when compared to NDM. In addition, stereotyped ordinal regression analysis showed that this progressive increase in RAP1 expression more strongly impacted CIN 2/3 than CIN 1. Our findings suggest that RAP1 may be a useful biomarker for the diagnosis of CIN.

Introduction

Cervical cancer, which is caused by high-risk *Human papillomavirus* (HR-HPV), is the second most frequent cancer in women worldwide [1]. Great efforts have been made during the last two decades to obtain useful markers that can be used in clinical practice for the proper

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

identification and follow-up of precursor lesions of cervical cancer, also known as cervical intraepithelial neoplasia (CIN). Currently, the main biomarkers applied for CIN detection are proteins related to the cell cycle, such as p16^{INK4A}, Ki-67, minichromosome maintenance 7 and 2 (MCM7 and 2), topoisomerase II alpha, and cyclin D1, all of which have altered expression due to the effects of HPV on the cell cycle. The p16^{INK4A} protein the best known surrogate biomarker of high grade lesions and also considered an indicator of the E6 and E7 overexpression in cervical lesions [2–5]. Among the small GTPases, current research indicates the participation of RAC1 and RHO in the progression of cervical neoplasia [6,7]. However, the participation of RAP1 GTPase in cervical carcinogenesis remains unknown.

RAP1 (RAS proximate 1), a small GTPase of the RAS superfamily, and its regulatory proteins are involved in cell cycle progression, differentiation, survival and adhesion [8,9]. RAP1 is activated by a wide variety of external stimuli, and it functions as a signal transducer that switches between its inactive GDP-bound form and its active GTP-bound form. This switch is regulated by several guanine nucleotide exchanger factors (GEFs), which serve as activators, and GTPase-activating proteins (RAPGAPs), which act as inactivators [10,11]. RAP1 seems to play a role in cancer cell growth, invasion, and metastasis, and dysregulation of RAP1 activation has been described in several malignant cell lines and cancers, such as oropharyngeal squamous cell carcinoma (SCC), papillary thyroid cancer, breast cancer, renal cell carcinoma, and melanoma [12–18].

Associations between HPV-mediated oncogenesis and alteration of the RAP1 signaling pathway have been described. The HR-HPV E6 oncoprotein targets the protein E6TP1, a known RAPGAP, for proteasome-dependent degradation and consequently enhances the GTP loading of RAP1 with subsequent activation of the MAPK signaling pathway and RAP1 overexpression [19,20]. Likewise, in HPV-infected epithelial cells, the interaction of the HPV E2 protein with the cellular bromodomain protein Brd4, a cell cycle progression regulator, enhances the RAP GAP activity of SPA-1, which disrupts the proper balance of RAP1 activation [21].

Those findings led us to investigate the expression levels of RAP1 in low- and high-grade CIN lesions to address the potential use of this putative oncogene as a cervical neoplasia biomarker. By comparing the immunostaining pattern of RAP1 in cervical specimens of CIN 1 and CIN 2/3 to that of non-dysplastic mucosa (NDM), we verified that RAP1 expression gradually increased with the severity of the cervical lesions. Moreover, we found a strong association of RAP1 overexpression in high grade lesions.

Materials and Methods

Ethics Statement

This cross-sectional study was approved by the institutional review board of the Universidade Federal de Minas Gerais (certificate number CAAE-0397.0.203.245–09). The need for written informed consent from the donor or the next of kin for the use of the paraffin-embedded samples in this research was waived by the institutional review board of the Universidade Federal de Minas Gerais.

Study Participants

Two hundred and fifty-two paraffin-embedded cervical biopsies, normal or NDM (n = 65), CIN 1 (n = 102) and CIN 2/3 (n = 85), were collected from different individuals between May 2009 and March 2011 from the archives of the Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. The majority of the patients were predominantly from the State of Minas Gerais, Brazil. Patients from other states, of the Southeast, North and Northeast regions of

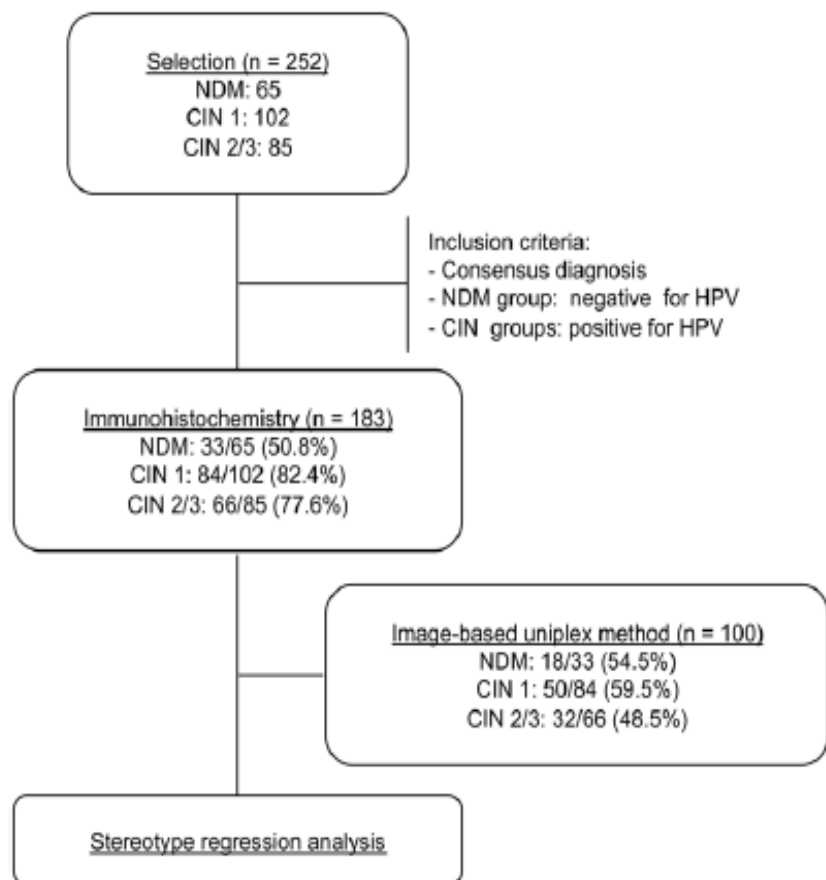


Fig 1. Study procedures and outcomes. The flow diagram shows the number of samples that were obtained from the laboratory file as well as those that were included in the immunohistochemistry and statistical analyses.

doi:10.1371/journal.pone.0123531.g001

Brazil were also included. The mean age of the patients was 38 years, ranging from 18 to 74 years old. Inclusion criteria were reviewed and classified as consensus diagnosis by two certified pathologists (M.A.P.X. and L.P.F.) and HPV DNA detection. The study procedures are summarized in the flow diagram shown in [Fig 1](#).

HPV genotyping

DNA was extracted from five serial sections (10 μm) of each paraffin-embedded sample using the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Düsseldorf, Germany) according to the manufacturer's instructions. Nested PCR amplification was performed using the external primers MY11 and MY09 and the internal primers GP5+ and GP6+, which were designed to amplify a 150-bp product from the L1 gene of several HPV types, as described elsewhere [22,23]. For HPV genotyping, the gel-purified, 150-bp amplicons (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN Inc., CA, USA) were sequenced in both directions (Applied Biosystems 3730 DNA Sequencer; Life Technologies, USA), and a BLAST search was carried out to identify the HPV types. DNA extracted from HPV-18-infected HeLa cells was used as a positive control. To determine the

DNA integrity and identify the presence of PCR inhibitors, all samples were also tested by PCR using primers PC03 and PC04, which amplified the beta-actin gene [24].

Immunohistochemistry

RAP1 and p16^{INK4A} immunostaining was performed on 4- μ m sequential sections of formalin-fixed, paraffin-embedded biopsy specimens using the Novolink Polymer Detection System (Novocastra, Leica Microsystems, USA). Deparaffinization with xylene and rehydration through a graded alcohol series was followed by antigen retrieval by heating to 90°C for 10 minutes in EDTA buffer, pH 9.0. After blocking endogenous peroxidases (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), the deparaffinized sections were incubated for 1 hour at room temperature with anti-RAP1 or anti-p16^{INK4A} antibodies (rabbit polyclonal to RAP1A+RAP1B; ab40814, Abcam, 1:120 dilution; mouse monoclonal to p16^{INK4A}, 551154; clone G175-405, BD Pharmingen Biosciences, dilution 1:110). The sections were then incubated at room temperature for 30 minutes with the Novolink polymer DS and washed twice with Tris-borate saline for 5 minutes. Peroxidase activity was developed using a diaminobenzidine (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) solution for 30 minutes at room temperature, counterstaining was performed using Harris hematoxylin, and then evaluated by light microscopy.

RAP1 and p16^{INK4A} expression levels in the NDM and CIN groups were evaluated according to criteria previously described by Galgano and collaborators [25]. The scoring of RAP1 and p16^{INK4A} was graded as pattern 0 (no staining), pattern 1 (weak staining in 5%-25% of the cells distributed in the basal third of the epithelium), pattern 2 (moderate staining in 26%-50% of the cells distributed in the basal third of the epithelial thickness), and pattern 3 (strong staining in >50% of the cells that were distributed in two-thirds of the entire epithelial thickness). RAP1 and p16^{INK4A} expression levels were considered normal for pattern 0 or 1 and high for pattern 2 or 3.

To limit the potentially subjective visual assessment of the RAP1 and p16^{INK4A} immunohistochemical score, we used the image-based uniplex method [16] to measure the relative intensity (RI) of RAP1 and p16^{INK4A} protein expression in a representative number of samples. The 16-bpp TIF images of the tissue were captured using an AxioCam MRC digital camera equipped with AxioVision software and attached to a Zeiss Axio microscope (Carl Zeiss Microscopy, Cambridge, UK). Images spanning the full range of intensity levels were analyzed using ImageJ 1.37v processing software (National Institutes of Health), which provided area and pixel value statistics of the user-selected region of interest (ROI). Ten 1-mm² areas were selected as ROIs in the epithelium and stroma by a certified pathologist (M.A.P.X.). The RI of biomarker staining (relative protein expression) was calculated in RI units by dividing the mean pixel intensity of equal ROIs containing stroma ($I_{\text{background}}$) by the mean pixel intensity of equal ROIs containing epithelial cells (I_{test}). This algorithm accounted for variations in background staining related to the immunohistochemistry routine.

Statistical analysis

Associations between categorical variables were evaluated using Fisher's exact test, and differences between continuous variables were determined using the two-sample T-test. To estimate odds ratios (OR) and the corresponding 95% confidence intervals (CIs) for the association between CIN and change in RAP1 expression, we compared normal and high expression of NDM to that of CIN 1 and of CIN 2/3 and CIN 1 to that of CIN 2/3. To establish a relationship between CIN and the change in RAP1 expression, we fitted the stereotype ordinal logistic regression model, $\log\left[\frac{\pi_j}{\pi_{\text{NDM}}}\right] = \alpha_j + \beta_j x$, where $j = 2, 3$ represents the CIN 1 and CIN 2/3



Fig 2. Immunohistochemical staining of RAP1. Left—Squamocolumnar junction of non-dysplastic cervical mucosa (NDM) showing very weak immunostaining for RAP1 in the cytoplasm of basal cells and no staining in the intermediate and superficial cells. Middle—CIN 1 showing moderate staining for RAP1 in cells distributed in the basal third of the epithelium and showing RAP1 expression in neutrophils. Right—CIN 2/3 showing strong staining for RAP1 in cells diffusely distributed throughout the entire epithelial thickness, with nuclear translocation of RAP1.

doi:10.1371/journal.pone.0123531.g002

classes, respectively, and $x = 0, 1, 2, 3$ represents the RAP1 immunohistochemical expression, and we estimated the value of β as proposed by Anderson [26]. The coefficient significance was tested using the Log-likelihood method. A result was considered statistically significant when $p < 0.05$. The statistical analyses were performed using MINITAB 16 (Minitab Inc., State College, Pennsylvania) and R (Version 2.15.3; <http://www.r-project.org>) with the VGAM package statistical softwares.

Results

RAP1 expression and HPV detection

The RAP1 and p16^{INK4A} expression levels in NDM, CIN 1, and CIN 2/3 lesions are shown in Fig 2, in S1 Fig and Table 1, which also include the HPV-16, HPV-18 and HPV-31 types that were detected in the CIN groups. p16^{INK4A} was used as an immunohistochemical reference for our study. RAP1 was undetectable in 36.4% of the NDM samples (12/33), and once verified in the NDM group, RAP1 immunostaining was very weak and predominantly restricted to the basal layer of the epithelium in 42.4% of the samples (14/33) and was classified as pattern 1 (as described in Material and Methods). Only 7 of the 33 cases of NDM presented moderate staining of RAP1 in 26%-50% of the cells that were distributed in the basal third of the epithelial thickness (pattern 2). Unlike what was observed in NDM, RAP1 expression was observed in 100% of the CIN 1 samples. About half of the CIN 1 samples (43/84) presented a moderate RAP1 immunostaining in dysplastic cells in the basal third of the epithelium (pattern 2), and the other half presented weak immunostaining of RAP1 expression, as described for pattern 1. In contrast, 85% (56/66) of the CIN 2/3 lesions presented moderate or strong immunostaining, indicating much higher RAP1 expression levels in high-grade lesions than those observed in NDM or CIN 1 biopsies ($p < 0.001$). Indeed, a predominance of strong, diffuse RAP1 staining throughout the thickness of the epithelium was observed in 59.1% (39/66) of the CIN 2/3 lesions. Notably, p16^{INK4A} showed the same immunohistochemical patterns described by Galgano and colleagues in NDM, CIN1 and CIN2/3 samples [25]. Strong nuclear staining for RAP1 was observed in approximately 70% of the CIN 2/3 lesions (Fig 2C), while weak nuclear staining was only observed in some basal cells of the CIN 1 (Fig 2B and 2A). No cytoplasmic or nuclear staining was observed in intermediate or superficial cells of the NDM samples (Fig 2A). RAP1 was strongly expressed in neutrophils and endothelial cells and was weakly expressed in lymphocytes and stromal mononuclear cells (Fig 2B and 2C).

A predominance of HPV-16 in 60.7% (51/84) and 72.7% (48/66) of the CIN 1 and CIN 2/3 samples, respectively, was observed. HPV-18 was detected in 38.1% (32/84) and 25.8% (17/66)

Table 1. Scores of RAP1 and p16^{INK4A} immunohistochemical expression in precursor lesions of cervical neoplasia.

Immunohistochemistry	NDM	CIN 1	CIN 2/3
RAP1	N (%)	N (%)	N (%)
0	12 (36.4)	0 (0)	6 (9.1)
1	14 (42.4)	43 (51.2)	4 (6.1)
2	7 (21.2)	41 (48.8)	17 (25.8)
3	0 (0)	0 (0)	39 (59.1)
Total	33 (100)	84 (100)	66 (100)
p16^{INK4A}	N (%)	N (%)	N (%)
0	11 (33.4)	3 (3.6)	2 (3.0)
1	14 (42.4)	33 (39.3)	2 (3.0)
2	8 (24.2)	47 (56.0)	3 (4.5)
3	0 (0)	1 (1.2)	59 (89.4)
Total	33 (100)	84 (100)	66 (100)
Level expression	NDM	CIN 1	CIN 2/3
RAP1	N = 33	N = 84	N = 66
Normal (pattern 0 or 1)	26	43	10
High (pattern 2 or 3)	7	41	56
p16^{INK4A}	N = 33	N = 84	N = 66
Normal (pattern 0 or 1)	25	36	4
High (pattern 2 or 3)	8	48	62
Presence of cervical	NDM	CIN 1	CIN 2/3
High-risk HPV DNA	N (%)	N (%)	N (%)
HPV-16	0 (0)	51 (60.7)	48 (72.7)
HPV-18	0 (0)	32 (38.1)	17 (25.8)
HPV-31	0 (0)	1 (1.2)	1 (1.5)

Abbreviations: NDM—non-dysplastic mucosa; CIN—cervical intraepithelial neoplasia.

doi:10.1371/journal.pone.0123531.t001

of the CIN 1 and CIN 2/3 samples, respectively. HPV-31 was detected in only one sample from each group (Table 1).

Morphometric evaluation of RAP1 expression

To limit the subjective visual assessment of immunohistochemical staining, we also performed a morphometric evaluation of RAP1 and p16^{INK4A} expression levels. We measured the relative intensity (RI) of chromogen staining as a measure of the relative RAP1 and p16^{INK4A} protein expression in NDM, CIN 1, and CIN 2/3 lesions (Fig 3). Our data showed higher RAP1 expression in CIN 2/3 samples compared to NDM and CIN 1 samples ($p < 0.05$) and in CIN 1 samples compared to NDM samples ($p < 0.05$), similar to the data obtained by standard microscopy analyses. RAP1 and p16^{INK4A} immunohistochemical morphometric patterns were similar except for the significant difference ($p < 0.05$) between RAP1 and p16^{INK4A} expression observed in the CIN2/3 group (Fig 3).

Overexpression of RAP1 and CIN progression

The association between RAP1 expression and risk of CIN progression was determined to perform comparisons between all groups. The table 2 presents the odds ratios (ORs) and 95%

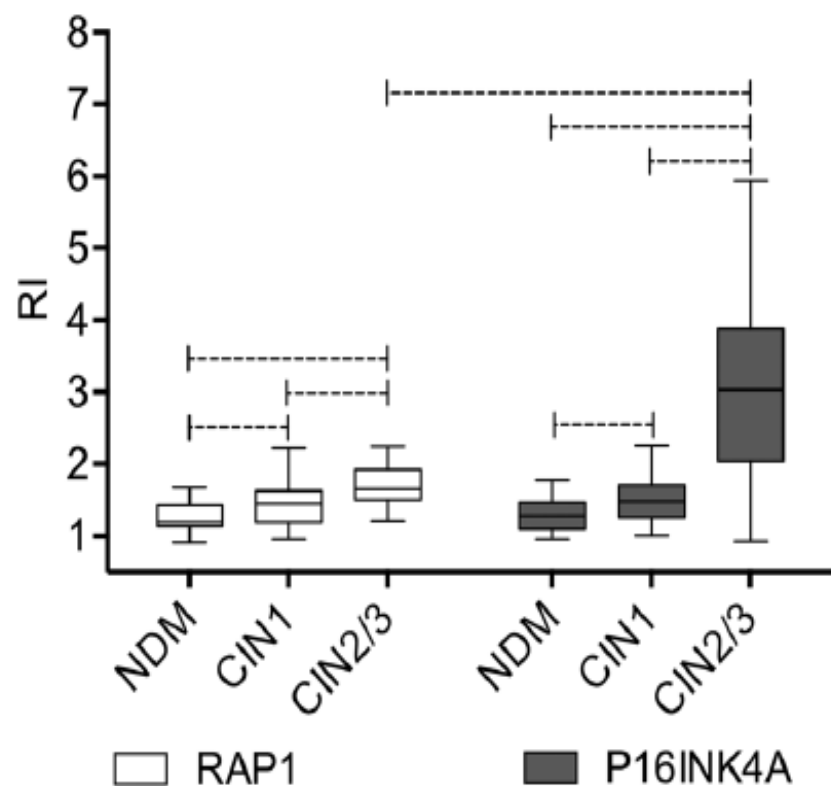


Fig 3. Morphometric analysis of RAP1 and p16^{INK4A} immunohistochemical staining. Relative Intensity (RI) data of RAP1 and p16^{INK4A} expression in NDM, CIN 1, and CIN 2/3 samples are expressed in box plot format, with boxes stretching from the 25th percentile to the 75th percentile and the line across the box representing the median values. Statistically significant differences ($p < 0.05$) are shown by dotted lines.

doi:10.1371/journal.pone.0123531.g003

confidence intervals (CIs) for the study of association between RAP1 expression levels (normal and high) in the NDM, CIN 1, and CIN 2/3 samples. We observed that high levels of RAP1 raised the risk of CIN 1 by 3.5 fold [(OR) = 3.50; 95% confidence interval (CI) 1.30–10.64] and the risk of CIN 2/3 by nearly 20 fold (OR = 19.86, 95% CI 6.40–70.80) compared to NDM and increased the risk of CIN 2/3 5.8 fold (OR = 5.80; 95% CI 2.51–14.52) compared to CIN 1.

The relationship between CIN grade and variation in RAP1 expression were determined using stereotype regression analysis. The table 3 summarizes the results of the fitted model. According to the model, $\log\left[\frac{\pi_j}{\pi_{NDM}}\right] = \alpha_j + \beta_j x, j = 2,3$ and $x = 0,1,2,3$ and with identifiability constraints ($\beta_{CIN 2/3} = 1, \beta_{NDM} = 0$) as in Anderson and colleagues (26), we estimate $\beta_{CIN 2/3} = 0.36$ and $\beta = 2.98$. Therefore, we estimated the relation between risks ratio and RAP1

Table 2. Associations between RAP1 expression and risk of CIN progression.

Ratio	OR	95% CI	p-value
CIN 1 / NDM	3.50	1.30,10.64	<0.001
CIN 2/3 / NDM	19.87	6.40,70.80	<0.001
CIN 2/3 / CIN 1	5.80	2.51,14.52	<0.001

Abbreviations: OR—Odds ratio; NDM—non-dysplastic mucosa; CIN—cervical intraepithelial neoplasia.

doi:10.1371/journal.pone.0123531.t002

Table 3. Estimated coefficients, standard errors, z-scores, and two-tailed p-values for the fitted stereotype regression model.

Coefficients	Estimate (95% CI)	SE	z-score	p value
θ_{NDM}	0*	—	—	—
$\theta_{\text{CIN 1}}$	0.36 (0.22,0.50)	0.07	4.73	<0.001
$\theta_{\text{CIN 2/3}}$	1*	—	—	—
$\alpha_{\text{CIN 1}}$	-0.30 (-1.04,0.44)	0.38	-0.79	0.2146
$\alpha_{\text{CIN 2/3}}$	-4.56 (-6.05,-3.07)	0.76	-5.97	<0.001
β	2.98 (2.16,3.80)	0.42	7.10	<0.001

Log-likelihood: -136.46

Abbreviations: SE—Standard error; NDM—non-dysplastic mucosa; CIN—cervical intraepithelial neoplasia.

* Identifiability constraints proposed by Anderson [26].

doi:10.1371/journal.pone.0123531.t003

expression is $\log \left[\frac{\pi_{\text{CIN 2/3}}}{\pi_{\text{NDM}}} \right] = -4.56 + 2.98x$ for CIN2/3 and $\log \left[\frac{\pi_{\text{CIN 1}}}{\pi_{\text{NDM}}} \right] = -0.30 + (0.36)2.98x$ for CIN1. Beta value is statistically different from 1, showing the influence of the increasing in RAP1 in the risk of CIN compared to NDM.

However, since the estimate for the weight of the RAP1 expression influence in risks ratios for CIN1 class, $\theta_{\text{CIN 1}}$, is statistically smaller than 1, stereotype ordinal regression analysis also showed that this progressive increase of RAP1 impacts more strongly in CIN2/3 than CIN1. Deviance residuals of the model indicated general goodness of fit of the model to the obtained data.

Discussion

In this cross-sectional study, we found a strong association of RAP1 with a significant increased risk of progression of CIN 1 and CIN 2/3 by comparing the RAP1 protein expression levels at different degrees of cervical intraepithelial neoplasia using standard and semi-quantitative approaches. RAP1 expression levels were predominantly undetectable or basal in normal squamous mucosa, but RAP1 expression gradually increased according to the severity of the cervical lesions.

The two main limitations of this study were the quality of the DNA that was extracted from paraffin-embedded samples for HPV detection and typing and the subjective bias of the qualitative assessment of immunohistochemistry. To circumvent those limitations, we used a large number of cervical lesions and performed morphometric analysis, respectively. Another limitation was the interference of nonepithelial cell immunostaining in the RAP1 morphometric analyses. The constitutive expression of RAP1 in neutrophils, lymphocytes and endothelial cells may have interfered with the calculation of the relative intensity (RI) index due to the increased number of inflammatory cells and angiogenesis that was frequently observed during CIN progression [27].

A very weak RAP1 cytoplasmic expression was observed in the basal cells of some NDM samples presenting inflammatory infiltrate in its the stromal tissue (Fig 2A). This may be due to cell proliferation induced by the inflammatory process of the cervical mucosa. Interestingly, a very discrete immunostaining of p16^{INK4A} was also observed in some NDM inflammatory cervical samples (S1 Fig) as also described elsewhere [28].

We observed a strong nuclear staining for RAP1 in CIN 2/3 samples, as previously reported in oropharyngeal SCC cell lines and human oral cancer specimens, and for other small GTPases, such as RHO and RAC1, in premalignant lesions and cervical cancer [6,7,12,29]. Because only the active GTP-bound form of RAP1 translocates to the nucleus, we can infer that

the strong nuclear staining of RAP1 that was observed in the CIN 2/3 specimens indicated the presence of active RAP1 and its putative role in the malignant process [11,12].

In this context, RAP1 is a cellular biomarker because it can distinguish different groups of precursor lesions of cervical carcinoma [2,25]. As shown in Table 3, our analyses support the use of RAP1 as a CIN biomarker because both the coefficient $\alpha_{\text{CIN } 1}$ and coefficient $\alpha_{\text{CIN } 2/3}$ influence the β value. However, the weight of the growing shift in the immunohistochemical pattern of $\log \log \left[\frac{\pi_{\text{CIN } 2/3}}{\pi_{\text{NDM}}} \right]$ is much more relevant than in the $\log \log \left[\frac{\pi_{\text{CIN } 1}}{\pi_{\text{NDM}}} \right]$. For such risk estimates, we use the parsimonious stereotype model, which is more flexible and better preserves the ordered outcomes by imposing a linear structure in the model's logit [30,31]. In addition to its use as a diagnostic and potential risk progression biomarker, an advantage of RAP1 could be the manipulation of RAP1 signaling pathway components in the cervical microenvironment [32].

The very different expression patterns of RAP1, i.e., weak/moderate expression in CIN 1 lesions in contrast to the strong RAP1 expression observed in the vast majority of CIN 2/3 lesions, suggest a distinct influence of HPV on RAP1 expression during the development of cervical carcinogenesis. CIN 1 and epithelial mucosa persistently infected with HPV are characterized by high levels of cytoplasmic and nuclear HPV E2 protein, which binds to the Brd4 protein, a cellular protein that mediates several processes important for the viral life cycle, including viral genome maintenance and replication [33,34]. When bound to Brd4, E2 competes with SPA-1, a RAPGAP. Hence, it is possible that E2-Brd4 binding favors the dysfunction of SPA-1, creating a hyperactive state of RAP1 [35]. On the other hand, overexpression of HR-HPV E6 protein, especially after integration of the HPV genome into the host genome in high-grade dysplasia (CIN 2/3), may activate RAP1-mediated signaling pathways during cellular transformation through the down-regulation of E6TP1 [36].

Our results suggest that RAP1 GTPase acts as a new biomarker with potential clinical value for severity assessment of cervical epithelial neoplasia. However, studies of RAP1 expression and its regulators in epithelial cells that are associated with HPV infection as well as prospective observational studies with a long-term follow-up will be required to elucidate the role of RAP1 in cervical carcinogenesis and to identify the clinical relevance of RAP1 in cervical cancer progression.

Supporting Information

S1 Fig. Immunohistochemical staining of p16^{INK4A}. Left—Squamocolumnar junction of non-dysplastic cervical mucosa (NDM) showing very weak immunostaining for p16^{INK4A} in the cytoplasm of basal cells and no staining in the intermediate and superficial cells. Middle—CIN 1 showing moderate staining for p16^{INK4A} in cells distributed in the basal third of the epithelium. Right—CIN 2/3 showing very strong staining for p16^{INK4A} in cells diffusely distributed throughout the entire epithelial thickness.

(TIF)

S1 Dataset. Data set for Fig 3 “Morphometric analysis of RAP1 and p16^{INK4A} immunohistochemical staining.”

(XLSX)

S2 Dataset. Dataset for Table 1 “Scores of RAP1 and p16^{INK4A} immunohistochemical expression in precursor lesions of cervical neoplasia”.

(XLSX)

S3 Dataset. Dataset for Table 2 “Associations between RAP1 expression and risk of CIN progression”.

(XLSX)

S4 Dataset. Dataset for Table 3 “Estimated coefficients, standard errors, z-scores, and two-tailed p-values for the fitted stereotype regression model”.

(XLSX)

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Lúcia Porto Fonseca (certified pathologist) for revising all cases included in this study and to João Rodrigues dos Santos, Clari Gandra and Luciana Lisboa from UFMG and CPqRR for their excellent technical support. The authors are also thankful for the financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), PDTIS-Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MAPX JGO PCPF. Performed the experiments: MAPX ACCF LIG VPM CECS. Analyzed the data: PCPF JGO MAPX MAC IAR. Contributed reagents/materials/analysis tools: CAB EGK. Wrote the paper: MAPX IAR JGO PCPF.

References

- zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:342–50. PMID: [12044010](#)
- Portari EA, Russomano FB, de Camargo MJ, Machado Gayer CR, da Rocha Guillobel HC, Santos-Rebouças CB, et al. Immunohistochemical Expression of Cyclin D1, p16(INK4a), p21WAF1, and Ki-67 correlates with the severity of cervical neoplasia. *Int J Gynecol Pathol*. 2013; 32:501–8. doi: [10.1097/PGP.0b013e31826f5c8b](#) PMID: [23896712](#)
- Lobato S, Tafuri A, Fernandes PA, Callari MV, Silva MX, Xavier MA, et al. Minichromosome maintenance 7 protein is a reliable biological marker for human cervical progressive disease. *J Gynecol Oncol*. 2012; 23:11–5. doi: [10.3802/jgo.2012.23.1.11](#) PMID: [22355461](#)
- von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M, Schmidt D, Bergeron C. (2012) Biomarkers for cervical cancer screening: the role of p16(INK4a) to highlight transforming HPV infections. *Expert Rev Proteomics*. 2012; 9:149–63. doi: [10.1586/epr.12.13](#) PMID: [22462787](#)
- Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Kollopoulos G, Martin-Hirsch P, et al. p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2009; 35:210–20. doi: [10.1016/j.ctrv.2008.10.005](#) PMID: [19261387](#)
- Mendoza-Catalán MA, Cristóbal-Mondragón GR, Adame-Gómez J, del Valle-Flores HN, Coppe JF, Sierra-López L, et al. Nuclear expression of Rac1 in cervical premalignant lesions and cervical cancer cells. *BMC Cancer*. 2012; 12:116. doi: [10.1186/1471-2407-12-116](#) PMID: [22443139](#)
- Tibúrcio MG, Pinheiro NM, Carboni Sde S, Rocha LP, Adad SJ, Maluf PJ, et al. GTPases Rho distribution in intraepithelial and invasive neoplasias of the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2014; 35:284–8. PMID: [24984542](#)
- Gloerich M, Bos JL. Regulating Rap small G-proteins in time and space. *Trends Cell Biol*. 2011; 21:615–23. doi: [10.1016/j.tcb.2011.07.001](#) PMID: [21820312](#)
- Hatori M, Minato N. RAP1 GTPase: functions, regulation, and malignancy. *J Biochem*. 2003; 134:479–84. PMID: [14607972](#)
- Bos JL, de Rooij J, Reedquist KA. RAP1 signalling: adhering to new models. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2:369–77. PMID: [11331911](#)

11. Lafuente EM, Iwamoto Y, Carman CV, van Puijenbroek AA, Constantine E, Li L, et al. Active RAP1, a small GTPase that induces malignant transformation of hematopoietic progenitors, localizes in the nucleus and regulates protein expression. *Leuk Lymphoma*. 2007; 48:987–1002. PMID: [17487743](#)
12. Mitra RS, Zhang Z, Henson BS, Kumit DM, Carey TE, D'Silva NJ. RAP1A and RAP1B ras-family proteins are prominently expressed in the nucleus of squamous carcinomas: nuclear translocation of GTP-bound active form. *Oncogene*. 2003; 22:6243–56. PMID: [13679863](#)
13. Banerjee R, Henson BS, Russo N, Tsodikov A, D'Silva NJ. RAP1 mediates galanin receptor 2-induced proliferation and survival in squamous cell carcinoma. *Cell Signal*. 2011; 23:1110–8. doi: [10.1016/j.cellsig.2011.02.002](#) PMID: [21345369](#)
14. Banerjee R, Russo N, Liu M, Van Tubergen E, D'Silva NJ. RAP1 and its regulatory proteins: the tumor suppressor, oncogene, tumor suppressor gene axis in head and neck cancer. *Small GTPases*. 2012; 3:192–7. doi: [10.4161/sgtp.20413](#) PMID: [22684501](#)
15. Nellore A, Paziana K, Ma C, Tsygankova OM, Wang Y, Puttaswamy K, et al. Loss of RAP1GAP in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94:1026–32. doi: [10.1210/jc.2008-1042](#) PMID: [19066305](#)
16. Furstner DK, Mitra N, Wan F, Lewis R, Feldman MD, Fraker DL. Ras-related protein 1 and the insulin-like growth factor type I receptor are associated with risk of progression in patients diagnosed with carcinoma in situ. *Breast Cancer Res Treat*. 2011; 129:361–72. doi: [10.1007/s10549-010-1227-y](#) PMID: [20976540](#)
17. Kim WJ, Gershey Z, Daaka Y. RAP1GAP regulates renal cell carcinoma invasion. *Cancer Lett*. 2012; 320:65–71. doi: [10.1016/j.canlet.2012.01.022](#) PMID: [22266190](#)
18. Gao L, Feng Y, Bowers R, Becker-Hapak M, Gardner J, Council L, et al. 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*. 2006; 66:7880–8. PMID: [16912161](#)
19. Gao Q, Srinivasan S, Boyer SN, Wazer DE, Band V. The E6 oncoproteins of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein, E6TP1, and target it for degradation. *Mol Cell Biol*. 1999; 19:733–44. PMID: [9858596](#)
20. Singh L, Gao Q, Kumar A, Gotoh T, Wazer DE, Band H, et al. The high-risk human papillomavirus type 16 E6 counters the GAP function of E6TP1 toward small Rap G proteins. *J Virol*. 2003; 77:1614–20. PMID: [12502878](#)
21. 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*. 2004; 24:9059–69. PMID: [15456879](#)
22. Husnjak K, Grce M, Magdić L, Pavelić K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods*. 2000; 88:125–34. PMID: [10960700](#)
23. Fuessel Haws AL, He Q, Rady PL, Zhang L, Grady J, Hughes TK, et al. Nested PCR with the PGMV09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J Virol Methods*. 2004; 122:87–93. PMID: [15488625](#)
24. Nonogaki S, Wakamatsu A, Filho AL, Roteli-Martins C, d Loreto C, Maeda MY, et al. Molecular strategies for identifying human papillomavirus infection in routinely processed samples: focus on paraffin sections. *J Low Genit Tract Dis*. 2005; 9:219–24. PMID: [16205192](#)
25. Galgano MT, Castle PE, Atkins KA, Brix WK, Nassau SR, Stoler MH. Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. *Am J Surg Pathol*. 2010; 34:1077–87. doi: [10.1097/PAS.0b013e3181e8b2c4](#) PMID: [20661011](#)
26. Anderson JA. Regression and ordered categorical variables. *J R Stat Soc*. 1984; 46:1–30.
27. Mazibrada J, Rittà M, Mondini M, De Andrea M, Azzimonti B, Borgogna C, et al. Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol*. 2008; 108:112–20. PMID: [17936343](#)
28. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*. 2001; 92:276–84. PMID: [11291057](#)
29. Goto M, Mitra RS, Liu M, Lee J, Henson BS, Carey T, et al. RAP1 stabilizes beta-catenin and enhances beta-catenin-dependent transcription and invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 2010; 16:65–76. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-09-1122](#) PMID: [20028760](#)
30. Ahn J, Mukherjee B, Banerjee M, Cooney KA. Bayesian inference for the stereotype regression model: Application to a case-control study of prostate cancer. *Stat Med*. 2009; 28:3139–57. doi: [10.1002/sim.3693](#) PMID: [19731262](#)

31. Abreu MN, Siqueira AL, Cardoso CS, Caiatta WT. Ordinal logistic regression models: application in quality of life studies. *Cad Saude Publica*. 2008; 24(Suppl4):s581–91.
32. Schmid MC, Franco I, Kang SW, Hirsch E, Quilliam LA, Varner JA. PI3-kinase γ promotes RAP1 α -mediated activation of myeloid cell integrin $\alpha 4 \beta 1$, leading to tumor inflammation and growth. *PLoS One*. 2013; 8(4):e60226. doi: [10.1371/journal.pone.0060226](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060226) PMID: [23565202](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23565202/)
33. McPhillips MG, Oliveira JG, Spindler JE, Mitra R, McBride AA. Brd4 is required for E2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses. *J Virol*. 2006; 80:9530–43. PMID: [16973557](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16973557/)
34. McBride AA, McPhillips MG, Oliveira JG. Brd4: tethering, segregation and beyond. *Trends Microbiol*. 2004; 12:527–9. PMID: [15539109](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15539109/)
35. Yan J, Li Q, Llievens S, Tavemier J, You J. Abrogation of the Brd4-positive transcription elongation factor B complex by papillomavirus E2 protein contributes to viral oncogene repression. *J Virol*. 2010; 84:76–87. doi: [10.1128/JVI.01647-09](https://doi.org/10.1128/JVI.01647-09) PMID: [19846528](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19846528/)
36. Chakrabarti O, Veeraghavulu K, Tergaonkar V, Liu Y, Androphy EJ, Stanley MA, et al. Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic Ras. *J Virol*. 2004; 78:5934–45. PMID: [15140991](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15140991/)