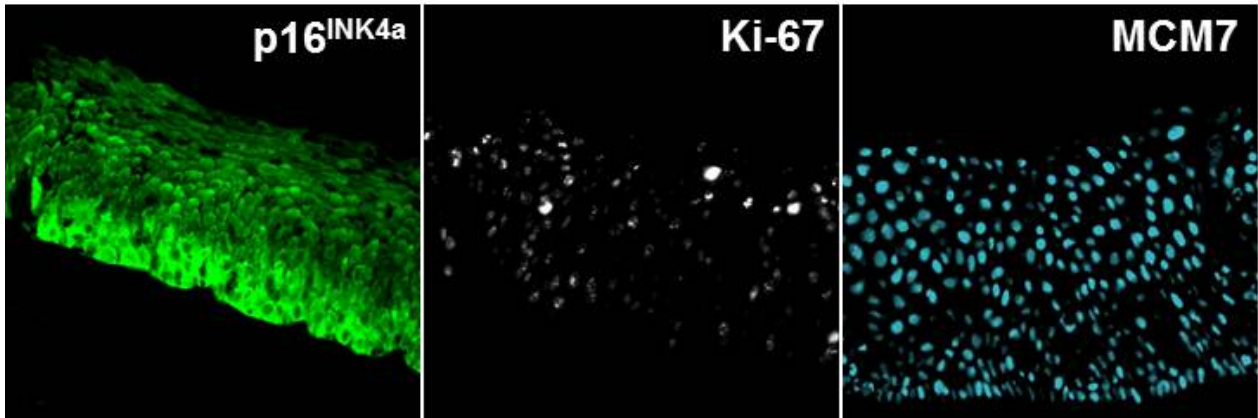


UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA  
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS P16<sup>INK4a</sup>,  
KI67 E MCM7 E DA INFECCÃO PELO  
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) NA  
PROGRESSÃO DAS LESÕES ESCAMOSAS  
INTRAEPITELIAIS DO COLO UTERINO**



**SORAYA LOBATO**

**Belo Horizonte**

**2011**

**SORAYA LOBATO**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS P16<sup>INK4a</sup>,  
KI67 E MCM7 E DA INFECÇÃO PELO  
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) NA  
PROGRESSÃO DAS LESÕES ESCAMOSAS  
INTRAEPITELIAIS DO COLO UTERINO**

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

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Annamaria Ravara Vago**

**Belo Horizonte**

**2011**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, o que seria de mim sem a fé que tenho nele.

À minha mãe, aos meus irmãos e toda minha família que, com muito carinho e apoio incondicional, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao Rodrigo, pelo seu amor, sua alegria, companhia, paciência e compreensão.

À professora e orientadora Annamaria pelo exemplo profissional e pessoal. Agradeço-lhe pelo apoio, confiança, incentivo e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos que me levaram a execução e conclusão desta tese.

Aos amigos e colegas, em especial, Dani, Keila, Alan e Chico pelo companheirismo e amizade nas horas de trabalho e descontração.

Aos colegas, professores e coordenadores da Pós-Graduação em Biologia Celular.

A todos os colaboradores e às pacientes que contribuíram para realização deste trabalho.

## RESUMO

O câncer do colo uterino é o segundo tipo mais comum entre as mulheres no mundo. O principal fator de risco para o desenvolvimento das lesões intraepiteliais e do carcinoma cervical é a infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV). Programas de triagem baseados na utilização de técnicas de diagnóstico citopatológico (teste de Papanicolaou) levaram a uma significativa redução das taxas de prevalência e mortalidade pelo câncer cervical. Entretanto, a eficiência do teste de Papanicolaou é afetada pela elevada variabilidade inter-observador e altos índices de resultados falso negativo e falso positivo. Até mesmo o método histopatológico, considerado o “padrão ouro” para diagnóstico definitivo das lesões cervicais, é afetado por certa taxa de variação inter-observador. Inúmeros estudos são direcionados ao desenvolvimento de biomarcadores que permitam a identificação de alterações e transformações celulares relacionadas à infecção produtiva pelo HPV e ainda, na identificação de lesões com o maior risco de progressão para o câncer cervical. P16<sup>INK4a</sup> é uma proteína supressora de tumor que se liga especificamente às quinases dependentes de ciclina CDK4 e CDK6, causando a parada do ciclo celular. Diversos estudos observaram que p16<sup>INK4a</sup> é tipicamente superexpressa no epitélio displásico e que as lesões intraepiteliais de alto grau exibem uma forte e difusa marcação para essa proteína. Da mesma forma, Ki-67 tem sido sugerido como um relevante marcador de proliferação celular no estudo de tumores humanos, incluindo o cervical. A avaliação de proteínas MCMs como marcadores de proliferação em células e tecidos humanos, tem sido realizada em diversos estudos, sugerindo que as MCMs poderiam ser moléculas úteis como marcadores de proliferação, com base no fato de que a expressão dessas proteínas é frequentemente demonstrada em células em proliferação, mas não em células em estado de quiescência, senescência ou diferenciação. A proposta do presente estudo é determinar o potencial de p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7 como biomarcadores de progressão e sua relação com a infecção pelo HPV.

## ABSTRACT

Cervical cancer is the second most common type of neoplasia, among women from different parts from the world. There is epidemiological evidence that, persistent infection of the cervix with oncogenic types of human papillomavirus (HPV) plays a preponderate role in the development of uterine cervical carcinoma. Since the Papanicolaou (Pap test) cytological screening for cervical precancerous lesions was introduced in the last 30 years, there has been a significant reduction in the incidence and mortality from cervical cancer. However, the efficacy of the Pap test is hampered by high inter-observer variability and high false negative and false positive rates. Even the histological assessment of cervical biopsies that is often considered as the “gold standard”, can be significantly hampered by intra- and inter-observer variability. Research nowadays is focused on the development of objective biomarkers that can distinguish transforming from productive HPV infections and predict disease severity. The cellular tumor suppressor protein p16<sup>INK4a</sup> is functionally able to block the activity of cyclin-dependent kinases CDK4/6 and interrupt the progression of the cell cycle. A higher expression of p16<sup>INK4a</sup> has been identified as a biomarker for transforming HPV infections. Several studies have found that p16<sup>INK4a</sup> is typically over expressed in the dysplastic epithelium. In addition, the high-grade scamous intraepithelial lesions (SILs) exhibit a strong and diffuse labeling for this cell cycle regulating protein. The Ki-67 antigen has been also considered by several studies, as a relevant biomarker for cell proliferation in numerous types of human tumors, including the cervical cancer. The Minichromosome Maintenance (MCM) proteins, which are replicating factors functionally involved in regulating the DNA replication initiation, have also been evaluated as proliferating markers in human tissues and cells. In the present study, the expression patterns of p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 and MCM7 proteins were evaluated in cervical tissue samples, to investigate the usefulness of these molecules as biomarkers for the progression of cervical intraepithelial lesions and for the occurrence of HPV infection. By means of a microscopy scanning - based on Indirect Immunofluorescence approach, the three biomarkers pattern expression was ascertained in cervical tissue samples without histopathological alterations, as in those presenting distinct grades of Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN). A complete absence of p16<sup>INK4a</sup> labeling was observed in the normal cervical epithelium, whilst a significant increase of the protein expression was detected according the severity of the cervical lesions. In addition, a positive correlation between the p16<sup>INK4a</sup> expression and the presence of HPV DNA was observed. Concerning the Ki-67

expression pattern through the cervical epithelium, it was also verified a significant correlation between the antigen expression and the severity grades of the intraepithelial lesions. However, it has not been observed any correlation between the Ki-67 expression and the HPV infection. Regarding the MCM7 expression in the cervical epithelium, it was verified a significant correlation between the protein labeling and the CIN grading, as well as the presence of HPV infection. By means of the comparison among the expression pattern presented by all the three analyzed biomarkers, it was verified a positive and significant correlation between the MCM7 expression and those corresponding to the two other markers, p16<sup>INK4a</sup> and Ki-67. Finally, when a comparative analysis was performed, between the expressions of the two proliferation markers through the cervical epithelium, a higher value of MCM7 LI (*Labeling index*) was observed in all the categories of the cervix epithelium. Based on the findings resulting from this study, it can be concluded that, p16<sup>INK4a</sup> and MCM7 can be considered valuable biomarkers and useful tools for discriminating between distinct and severe stages of the progressive cervical disease, and for detecting the associated presence of the HPV infection.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                     |  |
|---------------------|--|
| AO                  | Anticoncepcionais Orais  |
| AgNO <sub>3</sub>   | Nitrato de Prata   |
| AGUS                | <i>Atypical glandular cells of undetermined significance</i> (Células glandulares atípicas de significado indeterminado) |
| ARS                 | <i>Autonomously Replicating Sequence</i> (Sequências de Replicação Autônoma)   |
| ASCUS               | <i>Atypical squamous cells of undetermined significance</i> (Células escamosas atípicas de significado indeterminado)    |
| ATP                 | Adenosina Trifosfato   |
| BSA                 | <i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina Bovina Sérica)   |
| CAF                 | Cirurgia de Alta Frequência  |
| CCE                 | Carcinoma de Células Escamosas   |
| CDK                 | Cyclin-dependent Kinase (quinase dependente de ciclina)  |
| CDKI                | Cyclin-dependent Kinase Inhibitors (inibidores de quinase dependente de ciclina)   |
| CFD                 | Componente Fibrilar Denso  |
| CH                  | Captura Híbrida  |
| ChIP                | <i>Chromatin Immuno-precipitation</i> (Imuno-precipitação de Cromatina)  |
| CIS                 | Carcinoma <i>in situ</i>   |
| COEP                | Comitê de Ética em Pesquisa  |
| CPR                 | Complexo Pré-replicativo   |
| dd H <sub>2</sub> O | Água bidestilada   |
| DNA                 | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)   |
| dNTP                | Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados  |
| EGF                 | <i>Epidermal Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Epidérmico)   |
| EGFR                | <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (Receptor do Fator de Crescimento Epitelial)                                     |
| EIA                 | <i>Enzyme Immunoassay</i> (Imunoensaios Enzimáticos)   |
| FHA                 | Domínio <i>Forkhead-associated</i>   |
| HIS                 | Hibridização <i>in situ</i>  |
| HPV                 | <i>Human Papillomavirus</i> (Papilomavírus Humano)   |
| HPV-AR              | Papilomavírus Humano de Alto Risco   |

|       |   |
|-------|---|
| HSIL  | <i>High-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Escamosa Intraepitelial de Alto Grau)        |
| IARC  | <i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer) |
| ICB   | Instituto de Ciências Biológicas  |
| ICQ   | Imunocitoquímica  |
| IHQ   | Imunohistoquímica   |
| INCA  | Instituto Nacional do Câncer  |
| IP    | Índice de Proliferação  |
| JEC   | Junção Escamocolunar  |
| Kb    | <i>Kilobase</i> (1Kb = 1000 pares de base)  |
| Kda   | <i>Kilodalton</i> (1Kda = 1000 daltons)   |
| LAG   | Lesão de Alto Grau  |
| LBG   | Lesão de Baixo Grau   |
| LCR   | <i>Long Control Region</i> (Região Longa de Controle)   |
| LEI   | Lesão Escamosa Intraepitelial   |
| LI    | <i>Labeling Index</i> (Índice de Marcação)  |
| LSIL  | <i>Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Escamosa Intraepitelial de Baixo Grau)        |
| MCM   | <i>Minichromosome Maintenance</i> (Proteínas de Manutenção de Minicromossomas)                        |
| µg    | Micrograma  |
| µL    | Microlitro  |
| mL    | Mililitro   |
| µM    | Micromolar  |
| mM    | Milimolar   |
| µm    | Micrômetro  |
| NaOAc | Acetato de Sódio  |
| NaOH  | Hidróxido de Sódio  |
| ND    | Não determinado   |
| NIC   | Neoplasia Intraepitelial Cervical   |
| nm    | nanometro   |
| OMA   | <i>Oligonucleotide Microarray</i> (Microarray de Oligonucleotídeo)                                    |



|       |   |
|-------|---|
| ORC   | <i>Origin Recognition Complex</i> (Complexo de Reconhecimento da Origem)            |
| ORI   | Origem de Replicação  |
| pb    | Pares de Base   |
| PBS   | <i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução Salina Fosfatada)                         |
| PCR   | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)                   |
| PCNA  | <i>Proliferatin Cell Nuclear Antigen</i> (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) |
| PDGF  | <i>Platelet Derived Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas)  |
| PHT   | Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda  |
| pmol  | Picomol   |
| pRb   | Proteína do Retinoblastoma  |
| PV    | Papilomavírus   |
| RFC   | <i>Replication factor C</i> (Fator de Replicação C)                                 |
| RNA   | <i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)  |
| RPA   | <i>Replication protein A</i> (Proteína de Replicação A)                             |
| rpm   | Rotações por Minuto   |
| SIL   | <i>Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Escamosa Intraepitelial)              |
| SND   | Sobrenadante  |
| TBE   | Tampão Tris-Borato-EDTA   |
| TSBST | Tampão <i>Tris-buffered Saline</i> com <i>Tween 20</i>                              |
| UFMG  | Universidade Federal de Minas Gerais  |
| URR   | <i>Upstream Regulatory Region</i> (Região Regulatória localizada a 5' do Promotor)  |

## LISTA DE FIGURAS

|            |   |    |
|------------|---|----|
| FIGURA 1:  | Secções de lesões precursoras do Carcinoma de Células Escamosas .....   | 18 |
| FIGURA 2:  | Secções de Carcinoma Escamoso Invasor do Colo Uterino .....   | 19 |
| FIGURA 3:  | Esquema representativo dos fatores imunológicos, ambientais e virais que interferem na progressão das Lesões Escamosas Intraepiteliais para o Carcinoma Invasor .....                                 | 26 |
| FIGURA 4:  | Modelo tridimensional da superfície externa do Vírus do Papiloma Humano .....   | 27 |
| FIGURA 5:  | Organização do genoma do HPV .....  | 28 |
| FIGURA 6:  | Modelo da associação das oncoproteínas E6 e E7 com proteínas do ciclo celular .....   | 31 |
| FIGURA 7:  | Árvore Filogenética dos gêneros de Papilomavírus .....  | 33 |
| FIGURA 8:  | Ciclo de vida durante a infecção produtiva por HPV.....   | 36 |
| FIGURA 9:  | Modelo proposto para a integração do DNA viral .....  | 37 |
| FIGURA 10: | Modelo da associação da oncoproteína viral E7 dos HPVs de alto risco e as proteínas do ciclo celular .....  | 40 |
| FIGURA 11: | Curva de diluição e do tempo de incubação do anticorpo anti-p16INK4a em amostras cervicais de NIC III, utilizando-se a técnica de Imunofluorescência Indireta .....                                   | 68 |
| FIGURA 12: | Curva de diluição e do tempo de incubação do anticorpo anti-Ki67 em amostras cervicais de NIC III, utilizando-se a técnica de Imunofluorescência Indireta .....                                       | 69 |
| FIGURA 13: | Curva de diluição e do tempo de incubação do anticorpo anti-MCM7 em amostras cervicais de NIC III, utilizando-se a técnica de Imunofluorescência Indireta .....                                       | 71 |
| FIGURA 14: | Verificação de possível reação cruzada entre os anticorpos primários (anti-p16INK4a e anti-Ki67) pela técnica de Imunofluorescência Indireta em amostras cervicais de NIC III ....                    | 72 |
| FIGURA 15: | Expressão dos anticorpos anti-p16INK4a e anti-Ki67, em amostras de tecidos cervicais, pela utilização das técnicas de Imunohistoquímica (marcação pela Peroxidase) e Imunofluorescência Indireta..... | 74 |

|            |  |    |
|------------|--|----|
| FIGURA 16: | Expressão dos biomarcadores p16INK4a, Ki-67 e MCM7 em amostras de tecidos cervicais, pela utilização da técnica de Imunofluorescência Indireta ..... | 80 |
| FIGURA 17: | Amplificação do fragmento de 110 pb do gene de $\beta$ -globina humano e do fragmento viral de 150 pb pela PCR .....                                 | 83 |
| FIGURA 18: | Amplificação do fragmento de 149 pb do HPV 16 e do fragmento de 177 pb do HPV 18 .....   | 84 |

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| QUADRO 1: | Correlação das Terminologias utilizadas para descrição das Lesões Escamosas Intraepiteliais e Invasoras do Colo Uterino ..... | 20 |
| QUADRO 2: | Expressão de p16 <sup>INK4a</sup> em relação ao grau da neoplasia cervical e em amostras controles .....                      | 43 |
| QUADRO 3: | Positividade para o HPV e expressão de p16INK4a em relação ao grau da neoplasia cervical e em amostras controles .....        | 44 |
| TABELA 1: | Especificações dos anticorpos utilizados na técnica de Imunofluorescência Indireta .....                                      | 63 |
| TABELA 2: | Valores médios da expressão de p16INK4a, Ki-67 e MCM7 obtidos de acordo com o diagnóstico histopatológico..                   | 77 |
| TABELA 3: | Expressão de p16INK4a, Ki-67 e MCM7 obtidos de acordo com o diagnóstico histopatológico .....                                 | 77 |
| TABELA 4: | Valores Médios dos Índices de Marcação (LI - labeling index) dos Biomarcadores p16INK4a, Ki-67 e MCM7.....                    | 78 |
| TABELA 5: | Topografia da expressão de p16, Ki-67 e MCM7 obtidos de acordo com o diagnóstico histopatológico .....                        | 78 |
| TABELA 6: | Correlação da expressão da proteína MCM7 e as proteínas p16INK4a e Ki-67 em amostras cervicais .....                          | 81 |
| TABELA 7: | Análise da integridade do DNA genômico e da infecção e tipagem pelo Papilomavírus Humano (HPV) nas amostras cervicais .....   | 82 |
| TABELA 8: | Associação entre a expressão de p16INK4a e a presença do DNA do HPV .....   | 85 |

# SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1 REVISÃO DA LITERATURA .....  | 16 |
| 1.1 O Câncer do Colo do Útero .....  | 16 |
| 1.2 As Lesões Precursoras do Carcinoma de Células Escamosas .....  | 17 |
| 1.2.1 Classificação das Lesões Escamosas Intraepiteliais Cervicais .....   | 17 |
| 1.2.2 Métodos Clínico-Laboratoriais para o Diagnóstico das Neoplasias Cervicais .....                            | 20 |
| 1.2.3 Desenvolvimento de Biomarcadores Preditivos na Progressão da<br>Neoplasia Cervical .....                   | 22 |
| 1.2.4 Patogênese do Carcinoma Cervical de Células Escamosas .....  | 24 |
| 1.3 O Vírus do Papiloma Humano .....   | 26 |
| 1.3.1 Propriedades Gerais .....  | 26 |
| 1.3.2 O Genoma Viral .....   | 27 |
| 1.3.3 A Classificação do HPV .....   | 32 |
| 1.3.4 Métodos Moleculares Empregados no Diagnóstico da Infecção pelo HPV .....                                   | 34 |
| 1.3.5 O Ciclo de Vida do HPV .....   | 35 |
| 1.4 Expressão de Proteínas Envolvidas no Ciclo Celular nas Lesões<br>Intraepiteliais Cervicais e no Câncer ..... | 37 |
| 1.4.1 P16 <sup>INK4a</sup> - Propriedades Gerais .....   | 37 |
| 1.4.1.1 Expressão de p16 <sup>INK4a</sup> em Neoplasias Cervicais .....  | 41 |
| 1.4.2 Ki-67 - Propriedades Gerais .....  | 45 |
| 1.4.2.1 Expressão de Ki-67 em Neoplasias Cervicais .....   | 46 |
| 1.4.3 MCM7 – Propriedades Gerais .....   | 48 |
| 1.4.3.1 Componentes e Formação do Complexo Pré – Replicativo .....   | 49 |
| 1.4.3.2 Atividade de Licenciamento à Duplicação do DNA -“DNA Licensing” .....                                    | 52 |
| 1.4.3.3 Proteínas MCM como Marcadores de Proliferação Celular .....  | 54 |
| 2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA .....   | 57 |
| 3 OBJETIVOS .....  | 59 |
| 3.1 Objetivo Geral .....   | 59 |
| 3.2 Objetivos Específicos .....  | 59 |

|  |     |
|--|-----|
| 4 METODOLOGIA .....  | 60  |
| 4.1 Preparação das Amostras Cervicais: Coleta, Fixação e Processamento Histológico .....   | 60  |
| 4.2 Extração do DNA das Amostras .....   | 61  |
| 4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....   | 61  |
| 4.3.1 Amplificação de um Fragmento do Gene de $\beta$ -Globina Humano .....  | 61  |
| 4.3.2 Detecção da Infecção por HPV e Tipagem .....   | 62  |
| 4.3.2.1 Detecção do Genoma Viral .....   | 62  |
| 4.3.2.2 Tipagem dos HPVs.....  | 62  |
| 4.4 Imunofluorescência Indireta .....  | 63  |
| 4.4.1 Dupla Marcação com os anticorpos anti-p16 e anti-Ki67.....   | 64  |
| 4.4.2 Marcação com o anticorpo anti-MCM7 .....   | 65  |
| 4.5 Avaliação e Interpretação das Marcações de p16 <sup>INK4a</sup> , Ki-67 e MCM7.....  | 65  |
| 4.6 Análise Estatística .....  | 66  |
| <br>   |     |
| 5 RESULTADOS .....   | 67  |
| 5.1 Padronização da Técnica de Imunofluorescência para Análise das Proteínas<br>p16 <sup>INK4a</sup> , Ki-67 e MCM7 .....                  | 67  |
| 5.2 Expressão de Proteínas Envolvidas no Ciclo Celular (p16 <sup>INK4a</sup> , Ki-67 e MCM7) nas<br>Lesões Intraepiteliais Cervicais ..... | 75  |
| 5.2.1 Correlação entre a expressão dos biomarcadores p16INK4a, Ki-67 e MCM7 e o<br>grau da neoplasia cervical .....                        | 75  |
| 5.2.2 Correlação entre a expressão dos biomarcadores p16INK4a, Ki-67 e MCM7.....   | 81  |
| 5.3 Avaliação da Infecção pelo HPV e por Tipos de HPV de Alto Risco em Lesões<br>Intraepiteliais Cervicais .....                           | 81  |
| 5.3.1 Análise da integridade do DNA extraído das amostras estudadas .....  | 81  |
| 5.3.2 Detecção do DNA do HPV nas amostras cervicais estudadas .....  | 82  |
| 5.3.3 Tipagem dos HPVs nas amostras cervicais estudadas .....  | 83  |
| 5.4 Correlação da Expressão dos Biomarcadores p16INK4a, Ki-67 e MCM7 e a<br>Infecção pelo HPV em Lesões Intraepiteliais Cervicais .....    | 84  |
| <br>   |     |
| 6 DISCUSSÃO .....  | 86  |
| <br>   |     |
| 7 CONCLUSÕES .....   | 101 |

|                                    |     |
|------------------------------------|-----|
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... | 102 |
| 9 SEÇÃO DE ANEXOS .....            | 123 |

### 1.1 O CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

O câncer do colo do útero, assim como os demais tipos de câncer, é uma doença resultante de alterações que determinam um crescimento celular desordenado, não controlado pelo organismo e que, nesse caso, acomete o útero, em uma parte específica – o colo, porção fibromuscular inferior do órgão que fica em contato com a vagina (GOMPEL & KOSS, 1997).

No Brasil, existe uma grande variação nas taxas de incidência do câncer do colo do útero, sendo as maiores observadas nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. A ocorrência dessa neoplasia evidencia-se na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente na faixa etária de 50 a 60 anos. De todas as mortes por câncer em mulheres brasileiras da faixa etária entre 35 e 49 anos, 15% ocorrem devido a essa neoplasia (INCA, 2011).

Dentre todos os tipos, o câncer do colo do útero é o que apresenta um dos mais altos potenciais de prevenção e cura, próximo a 100%, quando diagnosticado precocemente (SCHLECHT *et al.*, 2003). Nos últimos anos o emprego de técnicas citológicas auxiliadas pela colposcopia, contribuiu para o conhecimento dessas lesões e instalação do seu tratamento com uma queda consequente da taxa dos cânceres invasivos (ARORA *et al.*, 2005; CLIFFORD *et al.*, 2006).

Apesar de ter sido um dos primeiros países a utilizar a colposcopia associada ao exame citopatológico (Papanicolaou), para a detecção precoce do câncer do colo do útero ou de suas lesões precursoras, o Brasil ainda possui uma das mais altas taxas de mortalidade por esse tipo de câncer. Para o ano de 2012, as estimativas de incidência do câncer de colo uterino no Brasil apontaram a ocorrência de 17.540 novos casos com um risco estimado de 17 casos a cada 100.000 mulheres. Na região Sudeste as estimativas de ocorrência de novos casos foram de 6.610, com um risco estimado de 15,53 por 100.000 mulheres. Nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo as estimativas de incidência do câncer de colo uterino foram respectivamente de 1.360, 2.030 e 2.880 novos casos. Em Belo Horizonte, estimou-se o surgimento de 200 novos casos em 2012 (INCA, 2011).



## 1.2 AS LESÕES PRECURSORAS DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Os carcinomas que acometem o colo uterino se subdividem em carcinoma de células escamosas invasor, adenocarcinoma e carcinoma neuroendócrino. Entre essas lesões neoplásicas, o carcinoma de células escamosas (CCE) é o tipo histológico mais comum, correspondendo a cerca de 90% de todas as neoplasias cervicais, ocorrendo em qualquer idade a partir da segunda década de vida até a senilidade, com pico de incidência entre 30 e 40 anos (ROSAI, 2004).

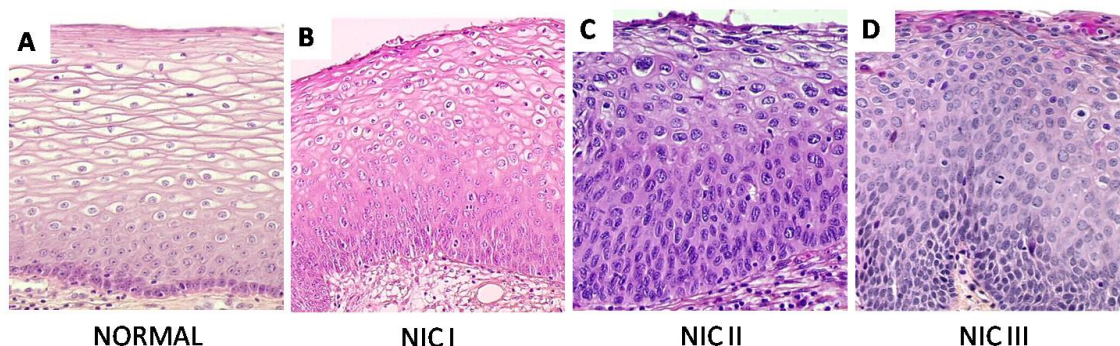
O carcinoma de células escamosas é precedido por uma série de modificações do epitélio original, que constituem as lesões pré-cancerosas ou Lesões Escamosas Intraepiteliais (LEIs) Cervicais, transformações intraepiteliais progressivas que podem evoluir para uma lesão cancerosa invasora, num prazo de 10 a 20 anos (PEREYRA *et al.*, 1996).

### 1.2.1 Classificação das Lesões Escamosas Intraepiteliais Cervicais

A terminologia das lesões intraepiteliais cervicais, precursoras do carcinoma escamoso invasor, sofreu contínua mudança desde a sua criação até os dias atuais. O termo displasia foi introduzido no final dos anos 50 para designar a atipia epitelial cervical intermediária entre o epitélio normal e o carcinoma *in situ* (CIS). A displasia recebeu uma categorização adicional em três grupos: leve, moderada e severa - dependendo do grau de comprometimento da espessura epitelial por células atípicas. Durante muitos anos, as lesões pré-neoplásicas cervicais foram indicadas segundo as categorias de displasia e CIS (MOUNT *et al.*, 2003).

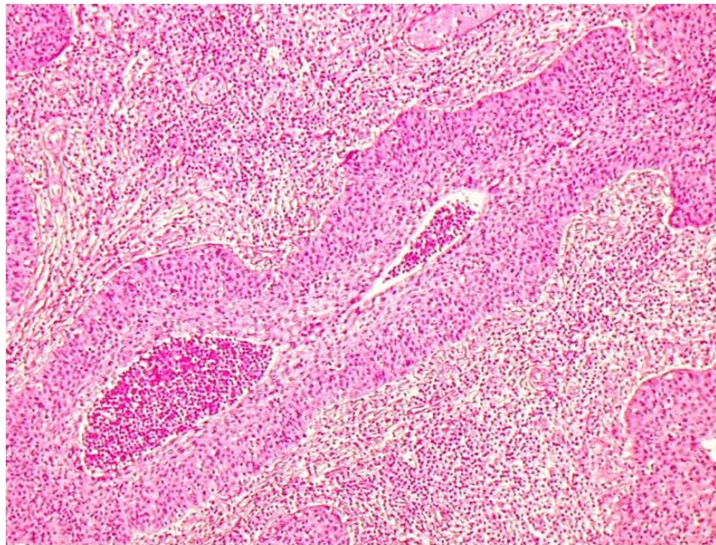
Com base nos achados provenientes de vários estudos de seguimento realizados com mulheres portadoras de displasia e CIS, verificou-se que o sistema de classificação acima, tornou-se insuficiente para a descrição dessas lesões. Além disso, a existência de eventos de progressão e regressão das lesões cervicais contribuiu para a elaboração do conceito de um processo patológico contínuo, pelo qual o epitélio normal poderia evoluir a lesões precursoras epiteliais, e até mesmo à neoplasia invasiva (SCHLETCHT *et al.*, 2003). Com base nas observações anteriores, foi introduzido, em 1968, o termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC), para indicar uma ampla gama de atipias celulares limitadas ao epitélio. Assim, as NICs foram divididas em 3 graus: NIC I correspondendo à displasia leve, NIC II à displasia moderada e NIC III à displasia severa e CIS (MOUNT *et al.*, 2003).

Dessa forma, quando a desordenação celular ocorre nas camadas mais basais do epitélio estratificado, verifica-se a presença de displasia leve ou neoplasia intraepitelial cervical grau I (NIC I). Estudos demonstram que cerca de 60% das mulheres com NIC I irão apresentar regressão espontânea, 30% poderão apresentar persistência da lesão como tal, e das demais, menos de 10% irão evoluir para NIC II, sendo a progressão para o câncer invasor, estimada em cerca de 1% dos casos (GOMPEL & KOSS, 1997; zur HAUSEN, 2002; SCHLETCHT *et al.*, 2003). A presença de uma desordenação que avança até os dois terços de espessura do epitélio, preservando as camadas mais superficiais, caracteriza a displasia moderada ou neoplasia intraepitelial cervical grau II (NIC II). Estima-se que na lesão de NIC II, 43% das mulheres irão apresentar regressão espontânea, 35% irão permanecer com essa lesão, 22% poderão progredir à NIC III e 1,5% ao câncer. Já na neoplasia intraepitelial cervical grau III (NIC III), um desarranjo é observado em todas as camadas do epitélio (Fig. 1). Cerca de 32% das mulheres portadoras dessa lesão, regredem ao normal, 56% persistirão com essa lesão e 12% progredirão ao câncer (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996; GOMPEL & KOSS, 1997; TAFURI, 1989; zur HAUSEN, 2002; SCHLETCHT *et al.*, 2003; SELLORS *et al.*, 2004).



**FIGURA 1: Secções de lesões precursoras do Carcinoma de Células Escamosas (Fonte: <http://screening.iarc.fr>). Letra A representa o epitélio escamoso normal com uma única camada de células basais, camadas intermediárias e superficiais ricas em glicogênio, apresentando núcleos picnóticos. Em B, observa-se neoplasia cervical de grau I com uma desorganização no terço basal do epitélio e coilócitos nas camadas superiores. C mostra NIC II com desorganização nos dois terços basais do epitélio, com critério celular de malignidade e infecção viral. Em D, as células apresentam um alto grau de anormalidade nuclear e celular em toda a espessura do epitélio, com a presença de mitoses típicas e atípicas. NIC – Neoplasia Intraepitelial Cervical; A-D: Coloração de HE, aumento DE 400X.**

Essa desordenação das camadas do epitélio escamoso é acompanhada pela presença de alterações celulares, que vão desde núcleos mais corados até figuras atípicas da divisão celular. A coilocitose, alteração apresentada por atipia nuclear e vacuolização perinuclear (um halo claro ao redor do núcleo), que indica a infecção pelo HPV, pode estar presente ou não. O carcinoma invasor apresenta alterações celulares mais intensas e alto grau de desarranjo, com células invadindo o tecido conjuntivo (estroma) do colo do útero abaixo do epitélio (Fig. 2) (PEREYRA *et al.*, 1996; GOMPEL & KOSS, 1997).



**Carcinoma Escamoso Invasor**

**FIGURA 2: Secção de Carcinoma Escamoso Invasor do Colo uterino (Fonte: <http://screening.iarc.fr>).** A figura representa um carcinoma de células escamosas invasor moderadamente diferenciado, com a presença de necrose e reação inflamatória. Coloração de HE, aumento DE 100X.

O Sistema de classificação das lesões cervicais sofreu nova alteração em 1988 quando foi criado o Sistema Bethesda, sendo o mesmo publicado em 1991 e revisado em 2001 (Quadro 1). Embora elaborado para a emissão de laudos citológicos, o Sistema Bethesda é também utilizado para a descrição de achados histopatológicos. Esse sistema propôs o uso do termo Lesão Escamosa Intraepitelial ou LEI (do inglês “Squamous Intraepithelial Lesions” ou SIL) para denominação dessas lesões e um esquema de categorização das lesões cervicais em dois graus. As lesões foram divididas em Lesões Escamosas de Baixo Grau ou LBG (do inglês *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions* ou LSIL) e Alto Grau ou LAG (do inglês *High-grade Squamous Intraepithelial Lesions* ou HSIL). A classificação de Bethesda

considera como LSIL as alterações compatíveis com o efeito citopático do HPV e as NIC de baixo grau (NIC I), enquanto que as HSIL compreendem as NICs mais avançadas, graus II e III (KURMAN *et al.*, 1991; SOLOMON *et al.*, 2002; APGAR *et al.*, 2003; SELLORS *et al.*, 2004).

| Terminologia da displasia                 | Terminologia original da NIC                                  | Terminologia modificada da NIC | Terminologia do sistema Bethesda (SIL) (1991)   |
|---|---|--------------------------------|---|
| Normal                                    | Normal  | Normal                         | Dentro de limites de normalidade<br>Alterações celulares benignas (infecção ou reparação)<br>ASCUS/AGUS |
| Atipia                                    | Atipia colocítica, condiloma plano, sem alterações epiteliais | NIC de baixo grau              | LSIL  |
| Displasia leve ou discariose leve         | NIC 1   | NIC de baixo grau              | LSIL  |
| Displasia moderada ou discariose moderada | NIC 2   | NIC de alto grau               | HSIL  |
| Displasia grave ou discariose grave       | NIC 3   | NIC de alto grau               | HSIL  |
| Carcinoma <i>in situ</i>                  | NIC 3   | NIC de alto grau               | HSIL  |
| Carcinoma invasivo                        | Carcinoma invasivo  | Carcinoma invasivo             | Carcinoma invasivo  |

**QUADRO 1: Correlação das Terminologias utilizadas para descrição das Lesões Escamosas Intraepiteliais e Invasoras do Colo Uterino (Fonte: <http://screening.iarc.fr>).**

NIC - neoplasia intraepitelial cervical, LSIL – *Low - grade Squamous Intraepithelial Lesions* (lesão escamosa intraepitelial de baixo grau), HSIL – *High - grade Squamous Intraepithelial Lesions* (lesão escamosa intraepitelial de alto grau), ASCUS - *Atypical squamous cells of undetermined significance* (células escamosas atípicas de significado indeterminado), AGUS - *Atypical glandular cells of undetermined significance* (células glandulares atípicas de significado indeterminado).

*1.2.2 Métodos Clínico-Laboratoriais para o Diagnóstico das Neoplasias Cervicais*

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

O método da colposcopia consiste na observação de aspectos normais ou anormais da ectocérvice e vagina, por meio de um colposcópio, aparelho que permite o aumento de 5 a 40

vezes do colo uterino, tornando possível a visualização da ectocérvice, da junção escamocolunar (JEC), das paredes vaginais e do fundo de saco. A observação de áreas suspeitas ou irregulares na superfície cervical indica a realização de uma biópsia. Áreas de epitélio aceto - branco, áreas de pontilhado, mosaico e vasos atípicos, áreas de condiloma acuminado, são achados característicos de alterações colposcópicas sugestivas de lesões malignas ou pré-malignas (TAFURI, 1989; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996; GOMPEL & KOSS, 1997; HALBE, 1998; DRESANG, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2006; SPITZER *et al.*, 2006).

O diagnóstico citológico das lesões cervicais é realizado por meio do teste de Papanicolaou, que consiste na análise das células oriundas da ectocérvice e da endocérvice, cujas amostras são obtidas por raspagem do colo do útero durante uma consulta ginecológica de rotina. O método baseia-se na interpretação das alterações de células individuais onde são avaliados critérios citológicos tais como, relação núcleo/citoplasma, formato do núcleo, intensidade de coloração do núcleo, arquitetura da cromatina, dentre outros. Diante da obtenção de um resultado anormal pelo teste de Papanicolaou, como a presença de células atípicas de significado indeterminado (ASCUS) ou de lesão intraepitelial de baixo ou de alto grau, é indicada a realização da colposcopia (GOMPEL & KOSS, 1997; HALBE, 1998; MONTEIRO *et al.*, 2006; ALLAN *et al.*, 2006; PAULO *et al.*, 2007).

O exame histopatológico, considerado o método padrão-ouro para o diagnóstico das lesões cervicais, é geralmente realizado em amostras de tecidos obtidas por meio de biópsia, após o encaminhamento da paciente à colposcopia (GOMPEL & KOSS, 1997). O material para estudo histopatológico é obtido através de biópsia incisional dirigida, biópsia em cone, curetagem endocervical ou biópsia excisional através da cirurgia de alta frequência (CAF). Por meio da análise microscópica é realizada a identificação da natureza da lesão, particularizando-se as lesões de caráter benigno e as de caráter pré - neoplásico ou neoplásico. A graduação histopatológica da biópsia cervical usa a terminologia NIC que equivale à categorização das lesões intraepiteliais escamosas utilizada pelo sistema Bethesda. Assim, a lesão intraepitelial escamosa de baixo grau corresponde à NIC I enquanto que as lesões intraepiteliais de alto grau incluem as NIC de grau II e III (Quadro 1) (BODÉN *et al.*, 1990; CARTA *et al.*, 1999; FALLANI *et al.*, 2002; PINTO *et al.*, 2005; CHACÓN *et al.*, 2007).

### *1.2.3 Desenvolvimento de Biomarcadores Preditivos na Progressão da Neoplasia Cervical*

Desde a introdução de métodos efetivos de triagem populacional, como os testes citológicos e colposcópicos, observou-se uma significativa redução nas taxas de incidência e mortalidade por câncer cervical, especialmente em países com programas de triagem bem estabelecidos. Entretanto, apesar do sucesso alcançado por esses programas, um número substancial de casos de câncer ainda ocorre mesmo em países desenvolvidos, revelando que os métodos de triagem apresentam algumas limitações como exposto a seguir (KLAES *et al.*, 2001, 2002; TERMINI & VILLA, 2008).

A eficiência do exame de Papanicolaou e do método de diagnóstico citológico é influenciada por dois aspectos intrínsecos a esses testes, que consistem (i) na alta variabilidade “inter – observadores” e (ii) na possibilidade de geração de resultados falso – negativos e falso-positivos, que atingem uma proporção de cerca de 20-30% e 5-70% dos testes, respectivamente (TSOUMPOU *et al.*, 2009). Os resultados falso – negativos são principalmente gerados por erros de amostragem e pela incorreta interpretação de células cervicais anormais, o que pode resultar na ausência de identificação de mulheres portadoras de lesões precursoras ou invasivas e em erros de diagnóstico (KLAES *et al.*, 2001). Por outro lado, a presença de alterações benignas (como as atipias de células de reserva) e de processos inflamatórios, pode originar resultados falso-positivos responsáveis pela realização desnecessária de testes citopatológicos e histopatológicos, e pela adoção de medidas de tratamento excessivas, tanto em mulheres participantes de programas de rastreamento como em pacientes convencionais (KLAES *et al.*, 2002; MURPHY *et al.*, 2005; TSOUMPOU *et al.*, 2009). Além disso, os métodos citológicos não permitem verificar a determinação do risco de progressão das lesões cervicais associadas à infecção por HPV (DOEBERITZ, 2002; TERMINI & VILLA, 2008).

Como apresentado adiante, a presença da infecção persistente por HPVs de alto risco está consistentemente associada com o desenvolvimento e a progressão de lesões da cérvix uterina (zur HAUSEN, 2002). O estabelecimento do HPV como agente etiológico do câncer do colo uterino promoveu, nas duas últimas décadas, o desenvolvimento e a implementação de metodologias moleculares para a detecção do DNA viral em amostras biológicas, sendo o uso dessas técnicas proposto como método complementar às estratégias de triagem e



diagnóstico convencionais (DOEBERITZ, 2002; NIEH *et al.*, 2005; TSOUMPOU *et al.*, 2009). De fato, estudos demonstraram que os testes moleculares podem ser satisfatoriamente integrados aos programas de rastreamento primário do câncer cervical, em combinação com a colposcopia e o teste de Papanicolaou, visando aumentar a sensibilidade desses programas (KOSS, 2000; LEE *et al.*, 2001). Da mesma forma, considera-se que os testes moleculares possam ser utilizados como ferramenta acessória do método de diagnóstico citopatológico, com o objetivo de auxiliar na interpretação de anormalidades citológicas equivocadas (NIEH *et al.*, 2005). Entretanto, os métodos de detecção do DNA do HPV apresentam algumas limitações, como a incapacidade de detecção do DNA viral na totalidade das lesões de baixo grau e a dificuldade de discriminação entre as infecções virais transitória e crônica. A discriminação entre estes dois tipos de infecção é crucial para se determinar a presença de infecção persistente, que pode predispor a uma progressão da lesão cervical (TSOUMPOU *et al.*, 2009).

Os aspectos acima destacados justificam a necessidade do desenvolvimento de biomarcadores efetivos, sensíveis e específicos, que permitam aumentar a qualidade e a potência dos métodos de triagem e diagnóstico das neoplasias cervicais, por meio da identificação de alterações e transformações celulares relacionadas e/ou decorrentes da infecção produtiva pelo HPV, e ainda, da identificação de lesões com maior risco de progressão maligna. As principais linhas de investigação focalizam a identificação de proteínas celulares, teciduais ou circulantes, cuja expressão se encontre alterada em resposta à expressão das oncoproteínas virais (KEATING *et al.*, 2001; KLAES *et al.*, 2001; LORENZATO *et al.*, 2005; QUEIROZ *et al.*, 2006; TERMINI & VILLA, 2008).

Vários biomarcadores têm sido avaliados quanto à sua especificidade na identificação de células displásicas ou neoplásicas, tanto em amostras citológicas quanto em biópsias cervicais. Na grande maioria dos trabalhos descritos na literatura, a detecção dessas moléculas é realizada por meio das técnicas de Citoquímica e Imunohistoquímica. Tais biomarcadores, correspondem a moléculas relacionadas (i) à sinalização celular, como o antígeno de membrana MN (glicoproteína transmembranosa expressa em células com o fenótipo maligno) e receptores de hormônios como o EGFR; (ii) à proliferação celular, como o antígeno de proliferação Ki-67; (iii) ao controle da duplicação do DNA, como as ciclinas D (Cdc6) e E, as proteínas de manutenção de minicromossomas ou MCM (do inglês *Minichromosome Maintenance*) de 2 a 7; (iv) ao controle e atividade do ciclo celular, como as proteínas

regulatórias p16<sup>INK4a</sup>, p53, p21, p27, entre outras (KEATING *et al.*, 2001; KLAES *et al.*, 2001; LORENZATO *et al.*, 2005; QUEIROZ *et al.*, 2006; TERMINI & VILLA, 2008).

Porém, como descrito adiante, o maior número de estudos desenvolvidos na literatura foi direcionado à avaliação dos níveis da proteína supressora de tumor p16<sup>INK4a</sup> em biópsias cervicais do colo uterino. A variação da expressão de p16<sup>INK4a</sup> têm sido amplamente investigada, cujo aumento apresenta forte associação com a presença de HPVs de alto-risco e o grau da neoplasia cervical (DOEBERITZ, 2002; ANDERSSON *et al.*, 2006; ISHIKAWA *et al.*, 2006; KALOF *et al.*, 2006; MASUMOTO *et al.*, 2003; QUEIROZ *et al.*, 2006; SAMAMA *et al.*, 2006; NAM *et al.*, 2008; TERMINI & VILLA, 2008; TSOUMPOU *et al.*, 2009).

#### *1.2.4 A Patogênese do Carcinoma Cervical de Células Escamosas*

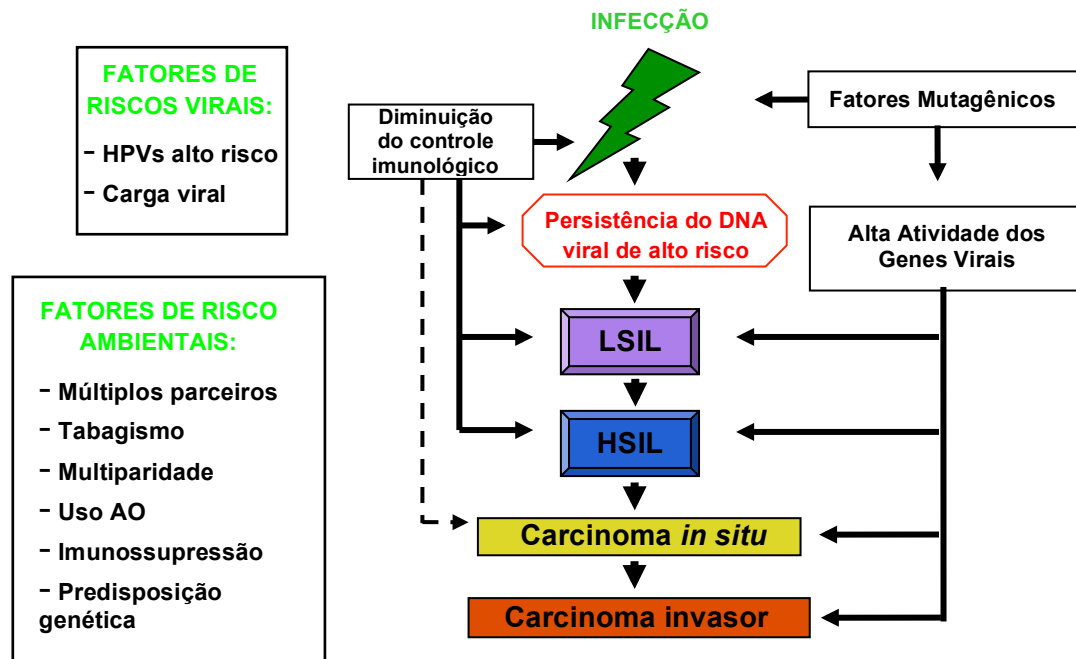
Diversos trabalhos epidemiológicos, desenvolvidos nas últimas três décadas, foram dedicados à elucidação dos fatores de risco associados à patologia do câncer cervical. Há cerca de 35 anos, foram publicados os primeiros trabalhos que postulavam o papel do Vírus do Papiloma Humano (HPV) na patogênese do câncer cervical (zur HAUSEN, 1977). Evidências atuais implicam a infecção por certos tipos oncogênicos de HPVs como um fator de risco essencial para o desenvolvimento do câncer cervical (BOSCH & MUÑOZ, 2002; BOSCH & SANJOSÉ, 2002; JASTREBOFF & CYMET, 2002; zur HAUSEN, 2009). Porém, embora a infecção persistente por HPVs de alto risco e a carga viral sejam a causa necessária para o desenvolvimento do câncer cervical, a presença de fatores de riscos imunológicos (a imunossupressão) e comportamentais (a presença de múltiplos parceiros sexuais, o tabagismo, a multiparidade e o uso de anticoncepcionais orais), acarretam um aumento na probabilidade de progressão das lesões cervicais em direção ao carcinoma invasor (BOSCH & SANJOSÉ, 2002; JASTREBOFF & CYMET, 2002).

O modelo atualmente mais aceito para a progressão de lesões intraepiteliais cervicais ao carcinoma, se baseia na infecção e persistência de HPVs de alto risco, que associados à deficiência imunológica e à exposição a fatores mutagênicos, poderiam causar a progressão das LSIL para as HSIL, podendo chegar ao carcinoma invasor (Fig. 3) (ANDERSON *et al.*, 2002; BOSCH & SANJOSÉ, 2002; zur HAUSEN, 2002; SELLORS *et al.*, 2004). Em relação à importância da carga viral, alguns estudos reportam que o aumento da carga viral de HPVs de alto risco tem influência significativa no desenvolvimento e progressão das LEIs. Assim,



elevados níveis de carga viral de HPVs oncogênicos poderiam ser usados como um marcador para progressão de lesões pré-cancerosas, embora a ocorrência de baixos níveis não exclua um possível surgimento de doença progressiva (DALSTEIN *et al.*, 2003; SONG *et al.*, 2007; TSAI *et al.*, 2005).

Estudos demonstram que o estado de imunossupressão representa um fator de risco à persistência da infecção viral e à progressão das lesões cervicais (SCOTT *et al.*, 2001; PATEL & CHIPLUNKAR, 2009). Contudo, a infecção por HPVs de alto risco resulta em progressão ao câncer cervical em apenas uma pequena porcentagem das mulheres imunocompetentes infectadas, após um longo período de latência, de modo que uma grande proporção das mulheres infectadas parece ser capaz de controlar a infecção viral por mecanismos imunológicos (PATEL & CHIPLUNKAR, 2009). Os fatores relacionados à persistência viral em mulheres imunocompetentes não são completamente entendidos. Alguns parecem resultar da modificação da atividade de proteínas celulares, envolvidas na apresentação de antígenos ou na cascata de sinalização celular responsável pela supressão da transcrição dos oncogenes virais (revisão em zur HAUSEN, 2000 e 2002; MANICKAM *et al.*, 2007). Assim, os eventos mais importantes na progressão das lesões cervicais podem ser resultado de uma desregulação na expressão das oncoproteínas transformantes E6 e E7, que levaria (i) ao aumento da proliferação celular nas camadas inferiores do epitélio, e (ii) à inabilidade do sistema de reparo em reparar corretamente o DNA celular (DOEBERITZ, 2002; MATTHEWS *et al.*, 2003; PATEL & CHIPLUNKAR, 2009). Alterações na transcrição de genes virais e do hospedeiro, associadas à atividade gênica viral e à amplificação persistente do DNA viral, contribuiriam para a geração de instabilidade do genoma celular e facilitariam a progressão das células infectadas para um crescimento invasivo (zur HAUSEN, 2002; MATTHEWS *et al.*, 2003; PATEL & CHIPLUNKAR, 2009).



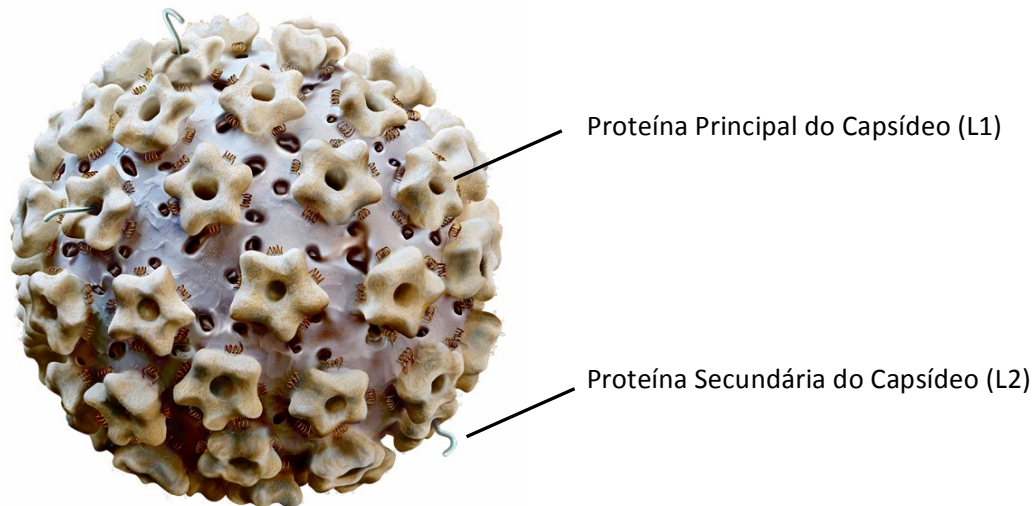
**FIGURA 3:** Esquema representativo dos fatores imunológicos, ambientais e virais que interferem na progressão das Lesões Escamosas Intraepiteliais para o Carcinoma Invasor (Fonte: zur HAUSEN, 2002; modificado). LSIL – *Low - grade Squamous Intraepithelial Lesions* (lesão escamosa intraepitelial de baixo grau), HSIL – *High - grade Squamous Intraepithelial Lesions* (lesão escamosa intraepitelial de alto grau), AO – Anticoncepcional Oral.

### 1.3 O VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV)

#### 1.3.1 Propriedades Gerais

O Vírus do Papiloma, pertencente à família *Papillomaviridae*, consiste em um vírion relativamente pequeno (55 nm) não envelopado. Possui um capsídeo icosaédrico composto por 72 capsômeros, que envolve um genoma de DNA circular de dupla fita (Fig. 4). Esses vírus são altamente específicos para seus respectivos hospedeiros e infectam o epitélio de revestimento da pele e de certas mucosas. Esse tropismo celular se traduz por interações específicas entre o vírus e sua célula hospedeira, o queratinócito (PEREYRA *et al.*, 1996; VILLA, 1997; de VILLIERS *et al.*, 2004).

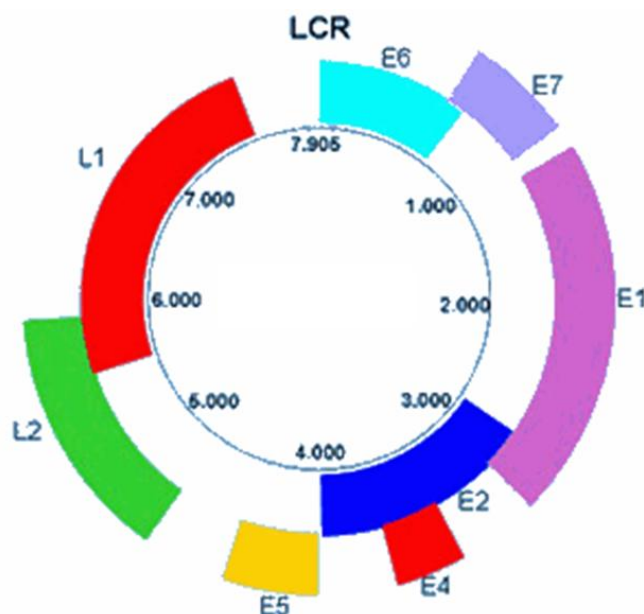
O HPV utiliza-se das células epiteliais, principalmente das escamosas, como hospedeiras, usurpando a maquinaria celular para a replicação do seu material genético e obtenção de sua progênie (TYRING, 2000; zur HAUSEN, 2002; DOORBAR, 2005).



**FIGURA 4: Modelo tridimensional da superfície externa do Vírus do Papiloma Humano** (Fonte: [www.guiadecotia.com.br](http://www.guiadecotia.com.br)). Os genes *L1* e *L2* codificam duas proteínas estruturais importantes, expressas nas camadas superiores do tecido infectado, assim que a replicação do genoma viral é finalizada. *L2* é uma proteína secundária do capsídeo e assim como *L1*, proteína principal do capsídeo, é produzida somente em células que expressam E4. A proteína *L1* é expressa depois de *L2*, permitindo a montagem das partículas infecciosas nas camadas superiores do epitélio.

### 1.3.2 O Genoma Viral

O genoma do HPV contém aproximadamente 8.000 pares de base, e pode ser dividido em três segmentos: região precoce, ou “early-region” (E), constituída por seis genes; região tardia, ou “late-region” (L), responsável pela codificação das duas proteínas estruturais do capsídeo viral, e região longa de controle, ou “long-control-region” (LCR), também denominada de “upstream regulatory region” (URR), (TYRING, 2000, zur HAUSEN, 2002). Essa última consiste em uma região não codificadora constituída por um segmento de DNA de 900 pares de base (pb) que contém a origem de replicação (ORI) viral e os elementos de controle transcricional, os quais regulam a expressão gênica do HPV (Fig. 5) (revisão em TYRING, 2000 e DOORBAR, 2005).



**FIGURA 5: Organização do genoma do HPV (Fonte: [www.ipoportom.in-saude.pt](http://www.ipoportom.in-saude.pt)).** O genoma do vírus do papiloma humano contém aproximadamente 8000 pares de bases e é dividido em três regiões: E (*early* ou precocemente transcrita); L (*late* ou tardiamente transcrita); LCR (*long-control-region* ou região longa de controle).

Os genes *E1* e *E2* são responsáveis, respectivamente, pela replicação do DNA viral e controle da transcrição dos demais genes, estando envolvidos na proliferação viral.

A proteína *E1*, fosfoproteína de 70 a 80 Kda - ATP dependente, interage com subunidades da DNA polimerase  $\alpha$  e ajuda no recrutamento de complexos de replicação celulares para a origem de replicação viral, além de facilitar a ligação de *E2* na região promotora. Apresenta um domínio de ligação ao DNA, um domínio de ligação à proteína *E2* e um domínio catalítico (revisão em LONGWORTH & LAIMINS, 2004).

A proteína *E2* é uma fosfoproteína com três domínios funcionais (N-terminal transativador com 220 aminoácidos, C-terminal de ligação ao DNA com 90 aminoácidos e um domínio central “hinge”), capaz de reconhecer e se ligar a uma sequência de DNA palindrômica na região de controle transcricional do HPV. *E2* pode então ativar ou reprimir a transcrição viral, dependendo da sua concentração nuclear e do tipo celular (TAYLOR *et al.*, 2003, WILSON *et al.*, 2002).

Em células malignas, a proporção entre *E1/E2* é modificada quando o genoma viral é integrado nos cromossomos da célula hospedeira, impedindo assim, a repressão dos genes virais *E6* e *E7*. A integração do DNA viral no genoma das células do hospedeiro, fenômeno

observado em situação de malignidade, promove a inativação do gene *E2* e a superexpressão dos genes *E6* e *E7* (TYRING, 2000).

O gene *E4* codifica uma proteína associada à maturação viral e à alteração da matriz intracelular, que é expressa nas camadas diferenciadas do epitélio em estágios tardios da infecção. A expressão desta proteína está co-localizada com a proteína L1 (SILVA *et al.*, 2002; BLACHON & DEMRET, 2003; ROBERTS *et al.*, 1997; TYRING, 2000).

A região de *E5* codifica uma proteína hidrofóbica preferencialmente encontrada no complexo de Golgi, no retículo endoplasmático e na membrana nuclear das células infectadas. A proteína *E5* é capaz de interagir com várias proteínas transmembranosas como os receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR), do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), entre outros (GENTHER *et al.*, 2003; FEHRMANN *et al.*, 2003; GROSS *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2002; BLACHON & DEMRET, 2003; MÜNGER *et al.*, 2002; MOTOYAMA *et al.*, 2004).

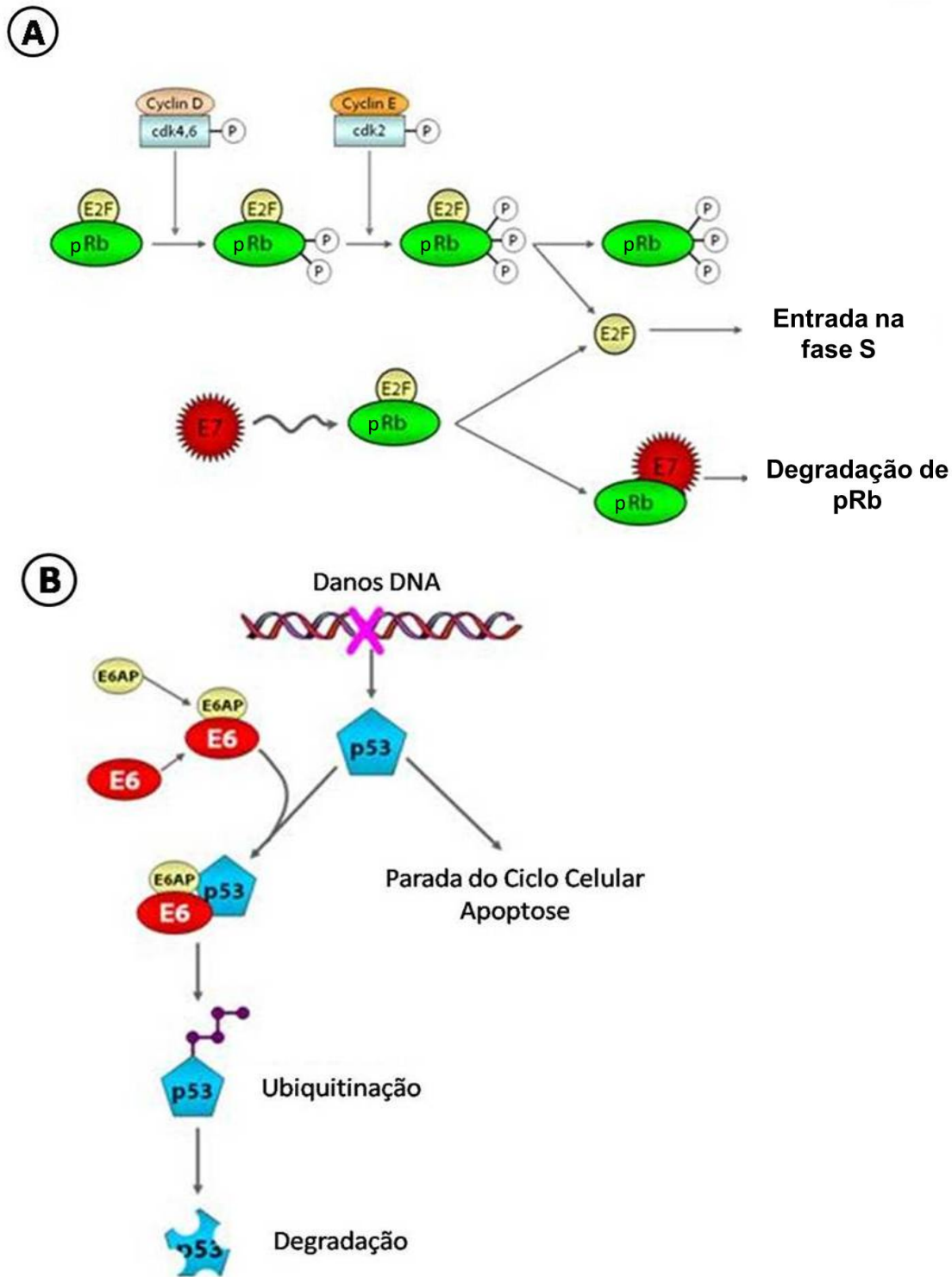
Os genes *E6* e *E7* codificam oncoproteínas que podem estimular a proliferação e a transformação das células hospedeiras, cooperando sinergicamente na imortalização celular. Ambas consistem em proteínas multifuncionais que podem associar-se a proteínas reguladoras do ciclo celular (Fig. 6) (DUENSING *et al.*, 2000, 2001; zur HAUSEN, 2000, 2003; MÜNGER *et al.*, 2002; YAMAMOTO *et al.*, 2004).

A oncoproteína *E7*, consiste em uma pequena fosfoproteína (100 aminoácidos), envolvida na transformação maligna das células epiteliais cervicais. A ação central de *E7* é baseada na sua habilidade de se ligar eficientemente à Proteína do Retinoblastoma (pRb), no sítio de ligação de fatores de transcrição, como membros da família E2F (Fig. 6A). Esta interação leva à fosforilação de pRb resultando na liberação do fator de transcrição E2F do complexo repressor transcricional pRb/E2F, permitindo a indução da proliferação celular. *E7* também é capaz de associar-se a outras proteínas envolvidas na proliferação celular, incluindo inibidores de CDK p21 e p27, histonas desacetilases e componentes do complexo de transcrição AP-1 (PARRY *et al.*, 1995; SAKAGUCHI *et al.*, 1996; zur HAUSEN, 2003; JO & KIM, 2005; QUEIROZ *et al.*, 2006).

A proteína *E6* complementa o papel desempenhado por *E7*, evitando a indução de apoptose em resposta à proliferação celular mediada por *E7*. A oncoproteína *E6* é capaz de se associar à proteína p53 via E6-AP (proteína associada à *E6*), resultando na ubiquitinação de p53 e subsequente degradação proteolítica. Este efeito anula a ativação transcricional e as propriedades repressoras de p53 e interrompe sua habilidade de bloquear o ciclo celular (Fig.

6B). Além da interação com a proteína p53, E6 também media a degradação de proteínas pro-apoptóticas, como Bak, e ativa a enzima telomerase da célula hospedeira (zur HAUSEN, 2003; DOORBAR, 2005; JO & KIM, 2005).

A região tardia (L) do genoma viral está relacionada à síntese vegetativa de DNA, síntese das proteínas do capsídeo e montagem das partículas virais. Os genes *L1* e *L2* codificam, respectivamente, a proteína principal e secundária do capsídeo viral. Estas proteínas são estruturalmente semelhantes e expressas nas camadas superiores do epitélio. Por codificarem proteínas estruturais, esses genes são especialmente conservados na grande maioria dos vários tipos de HPVs (HOWLEY *et al.*, 1996; TYRING, 2000; VILLA & PINHEIRO, 2001; de VILLIERS *et al.*, 2004).



**FIGURA 6: Modelo da associação das oncoproteínas E6 e E7 com proteínas do ciclo celular (Fonte: JO & KIM, 2005; modificado).** A – A fosforilação sequencial de pRb pelo complexo ciclina/CDK, inibe a atividade repressora de pRb com liberação do fator de transcrição E2F que induz a transcrição de vários genes. A proteína E7 de HPVs de alto risco se liga à forma hipofosforilada de pRb. Esta ligação interrompe o complexo formado por pRb e o fator de transcrição E2F, resultando na liberação de E2F e permitindo a célula entrar na

fase S do ciclo celular. B – A presença de danos ao DNA induz a ativação de p53, ocasionando a parada do ciclo celular ou apoptose. A proteína E6 de HPVs de alto risco se liga à p53 via E6-AP, resultando na ubiquitinação e rápida degradação de p53.

### *1.3.3 Classificação do HPV*

Os Papilomavírus (PV) são classificados, atualmente, pela homologia entre as sequências do gene *L1*, em gêneros, espécies, tipos, subtipos e variantes. Diferentes gêneros apresentam abaixo de 60% de similaridade entre as sequências do gene *L1*; até o presente momento, 16 gêneros já foram descritos (Fig. 7), sendo que cinco desses gêneros são compostos exclusivamente por PV que infectam humanos. As espécies dentro de um gênero compartilham entre 60% a 70% de identidade entre as sequências do gene *L1* (de VILLIERS *et al.*, 2004; DOORBAR, 2006).

Os dois principais gêneros dos HPVs são o Alfa e o Beta papilomavírus, com aproximadamente 90% dos HPVs descritos pertencendo a um destes grupos. Os Beta-papilomavírus estão tipicamente associados a infecções cutâneas inaparentes. No entanto, em indivíduos imunocomprometidos, esses vírus podem se disseminar sem controle e se tornarem associados ao desenvolvimento do câncer de pele não melanoma (DOORBAR, 2006; THOMISON *et al.*, 2008). O gênero Alfa papilomavírus corresponde ao maior e, clinicamente mais importante grupo. Nesse gênero estão classificados os tipos de HPV principalmente mucosotrópicos, embora contenha alguns vírus que possuem o tropismo por sítios cutâneos e causem verrugas comuns. Entretanto, esses vírus cutâneos compartilham certas características do ciclo de vida que são comuns ao gênero Alfa e que diferem de outros vírus cutaneotrópicos (DOORBAR, 2006).

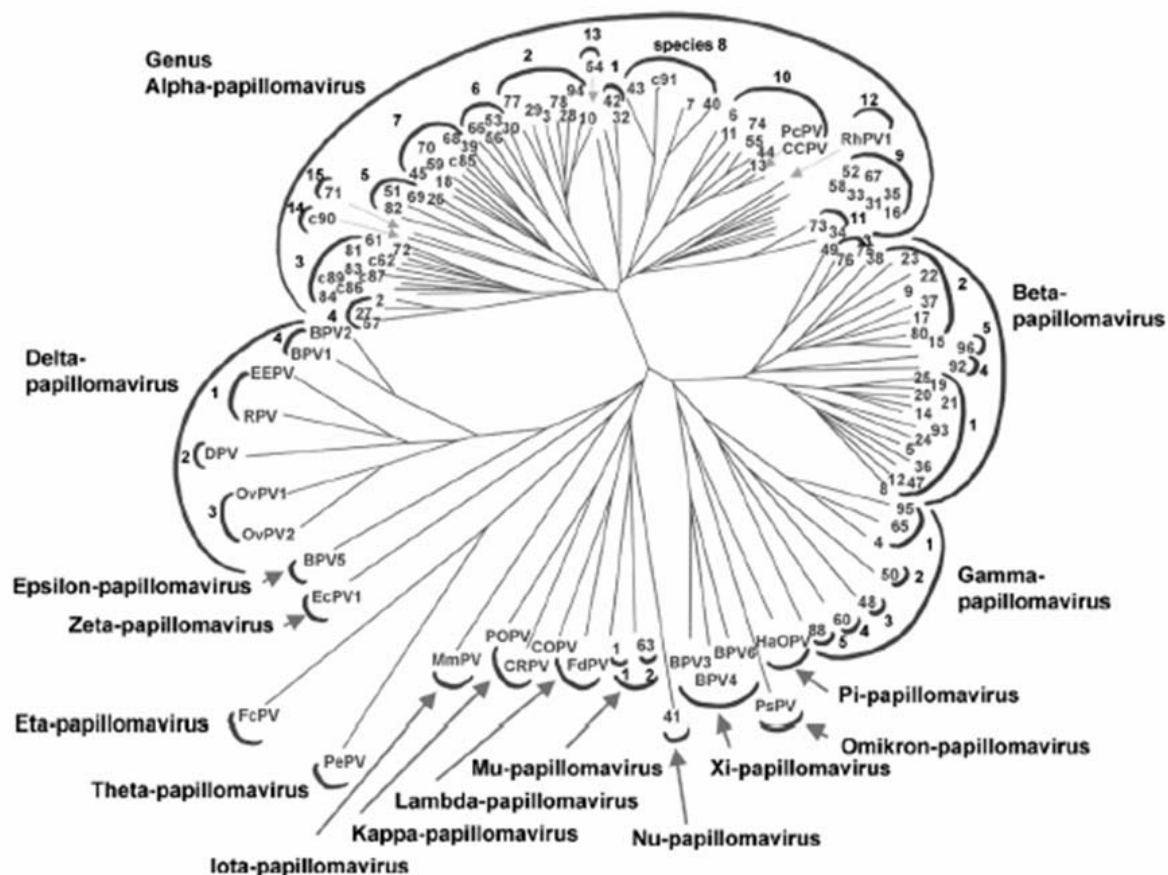
Os tipos de HPVs são reconhecidos quando demonstram diversidade da sequência de nucleotídeos do gene *L1* superior a 10%. Diferenças genômicas entre 2% e 10% definem um subtipo, enquanto que diferenças menores que 2% estabelecem uma variante viral (BURK *et al.*, 2009; de VILLIERS *et al.*, 2004).

Cerca de 30 tipos de HPVs são conhecidos por infectar o epitélio cervical. Dentre estes, 19 tipos foram classificados como vírus do papiloma humano de alto risco, devido à sua associação com a carcinogênese cervical. Os HPVs de alto risco são representados pelos tipos: 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82. O HPV 16 é o



mais prevalente HPV de alto risco sendo responsável por aproximadamente 50% de todos os cânceres cervicais (BURK *et al.*, 2009; DOORBAR, 2006).

Finalmente, os HPVs considerados de baixo risco para o desenvolvimento de câncer compreendem os tipos 6, 11, 13, 32, 40, 42, 44, 55, 54, 61, 71, 72, 81, 83, 84, e estão relacionados principalmente a lesões benignas, como condiloma e também a neoplasia intraepitelial cervical de grau I (BURK *et al.*, 2009; TYRING, 2000; DOORBAR, 2006).



**FIGURA 7: Árvore Filogenética dos gêneros de Papilomavírus (Fonte: DE VILLIERS *et al.*, 2004).** Os dois principais gêneros dos HPVs são o Alfa e o Beta papilomavírus, com aproximadamente 90% dos HPVs descritos pertencendo a um destes grupos. O gênero Alfa papilomavírus corresponde ao maior e, clinicamente mais importante grupo, onde estão inseridos os tipos de HPV principalmente mucosotrópicos, embora contenha alguns vírus que possuem o tropismo por sítios cutâneos e causem verrugas comuns.

### 1.3.4 Métodos Moleculares Empregados no Diagnóstico da Infecção pelo HPV

Uma vez que a presença de citologia cervical alterada é verificada por meio do exame citopatológico, é recomendado o uso de testes diagnósticos do DNA do HPV, cuja detecção depende estritamente da utilização de métodos moleculares. Esses testes, são direcionados à verificação da presença e tipagem do genoma viral e utilizam principalmente as metodologias da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polimerase Chain Reaction*), Captura Híbrida (CH) e Hibridização *in situ* (HIS).

A PCR consiste em uma técnica bastante sensível baseada na utilização de iniciadores específicos e complementares à região do DNA a ser amplificada, permitindo a detecção de segmentos dos genomas virais em amostras de DNA obtidas de pacientes (GOMPEL & KOSS, 1997). Para a detecção do HPV, os iniciadores GP5+ / GP6+ e MY09/MY11 são os mais utilizados, porque flanqueiam a região de L1 do genoma viral, que é conservada na maioria dos HPVs, variando somente em algumas sequências de nucleotídeos, as quais determinam o tipo viral (MANOS *et al.*, 1999; MOLIJN *et al.*, 2005). Outras regiões, como a LCR, E1, E6 e E7, também são utilizadas como alvo de amplificação, nos diversos estudos de detecção e tipagem dos HPVs (MOLIJN *et al.*, 2005; YAMAGUCHI *et al.*, 2002).

A Captura Híbrida (CH) é um teste de hibridização molecular, com detecção dos híbridos formados através de uma reação enzima-substrato e posterior leitura por quimioluminescência. Ao reagir com um conjunto de sondas gênicas específicas, o material para análise forma híbridos de RNA/DNA que são capturados por anticorpos que revestem as paredes de tubos ou de microplacas e detectados por quimioluminescência. A quantidade de DNA viral pesquisado na amostra da paciente é proporcional à intensidade da luz emitida. Este método não permite a identificação do tipo específico do HPV, permitindo apenas a separação de grupos de HPVs de alto e de baixo risco (LÖRINCZ, 1996; PEYTON *et al.*, 1998; HUBBARD, 2003).

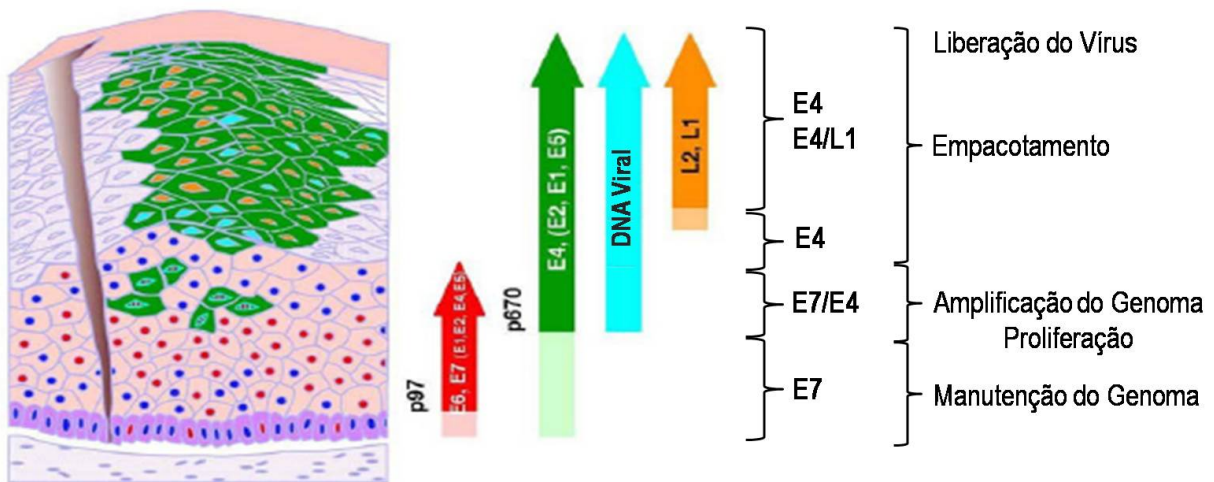
A Hibridização *in situ* permite a detecção de sequências virais diretamente de cortes de tecidos ou culturas de células, sendo a única técnica capaz de relacionar os dados histopatológicos e a presença viral. Nesse método são usadas sondas radioativas ou não-radioativas para avaliar a presença de sequências de DNA ou RNA virais, sendo a última relacionada à expressão de um gene viral. Não se trata de um método diagnóstico, pois a identificação do tipo viral presente no tecido em questão deve ser realizada por outra técnica (HUBBARD, 2003).

### 1.3.5 O Ciclo de Vida do HPV

O ciclo de vida do HPV é dependente da diferenciação das células do epitélio estratificado. Acredita-se que a infecção pelo HPV tenha início nas células basais ou parabasais do epitélio escamoso: à medida que estas se dividem, migram para outras camadas e se tornam diferenciadas. Ao se dividirem essas células infectadas pelo HPV, distribuem equitativamente o DNA viral entre as duas células filhas. Uma destas células inicia o processo de diferenciação e maturação, enquanto que a outra permanece não diferenciada na camada basal, servindo como um reservatório do DNA viral (DOORBAR, 2005; zur HAUSEN, 2000 e 2002).

A internalização do vírus é um processo lento e complexo que pode durar horas e que parece ocorrer via endocitose por vesículas cobertas por clatrina. O desnudamento do vírus, no interior da célula, permite que o DNA viral seja transportado para o núcleo. Após a infecção e o desnudamento, o genoma do HPV é estabilizado na forma de DNA episomal (DOORBAR, 2005; STUBENRAUCH & LAIMINS, 1999). Para a produção de vírions infecciosos, os vírus do papiloma devem replicar seu genoma e empacotá-lo em partículas virais. A replicação ocorre nas células em proliferação e requer a expressão de E4 e E5 cujas funções na replicação não estão bem definidas. A ligação de E2 à região regulatória do DNA viral é necessária para que ocorra a replicação viral e o recrutamento para a origem de replicação da proteína E1, que atua como uma helicase. Dessa forma, ocorre a replicação do DNA viral que é seguida da montagem do capsídeo viral, nas camadas mais superiores do epitélio (DOORBAR, 2005; GRM *et al.*, 2009; zur HAUSEN, 2000, 2002).

Para a síntese viral ser finalizada, os vírus do papiloma codificam as duas proteínas estruturais, L1 e L2, expressas nas camadas superiores do tecido infectado, assim que a replicação do genoma viral é finalizada. Desse modo, são formadas as partículas virais, que são liberadas somente quando as células infectadas alcançam a superfície do epitélio, uma vez que os papilomavírus não possuem ciclo lítico propriamente dito. Esse é o ciclo clássico de produção de vírus ou ciclo produtivo como esquematizado na Figura 8 (DOORBAR, 2005; TYRING, 2000).



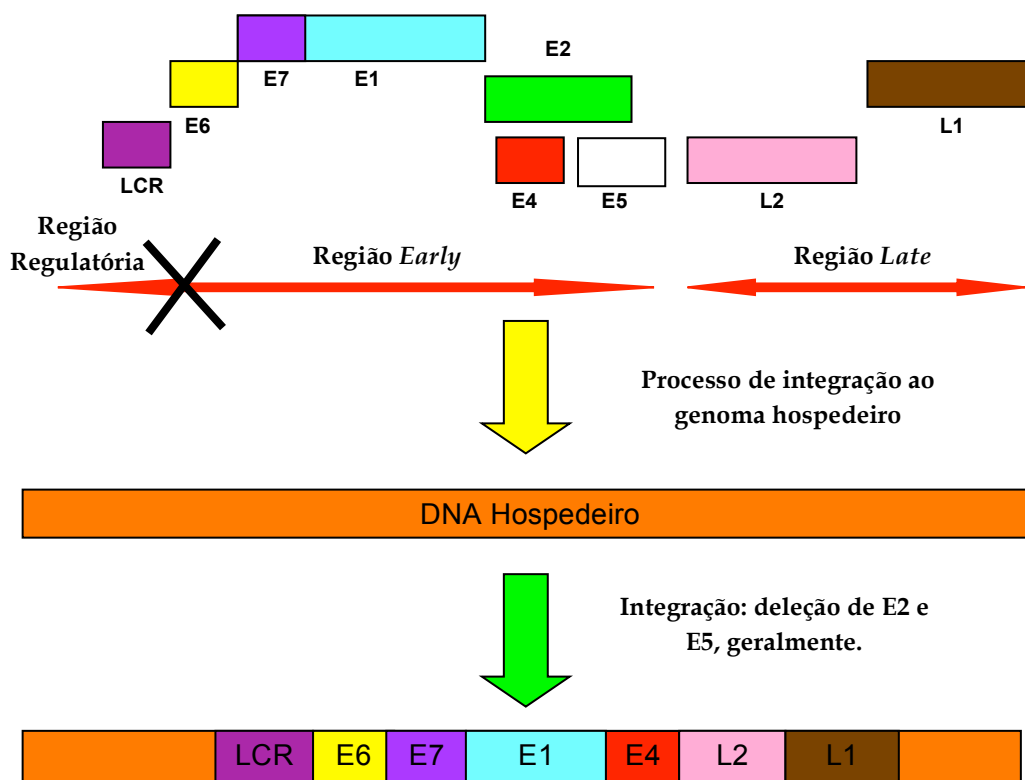
**FIGURA 8: Ciclo de vida durante a infecção produtiva por HPV. [Fonte: DOORBAR, 2005 (modificado)].** Representação da mucosa escamosa e expressão gênica do HPV 16. Durante a diferenciação epitelial, p97 promove a expressão dos oncogenes virais *E6* e *E7* (vermelho). Nas camadas superiores do epitélio, p670 induz proteínas de replicação viral (verde) facilitando a amplificação do genoma viral (azul). Os genes *L1* e *L2* (laranja) são expressos nas células superficiais.

No epitélio não infectado as células basais deixam o ciclo celular, migram para as camadas superiores e iniciam um processo de diferenciação terminal. Porém, na fase proliferativa da infecção pelo HPV, a diferenciação e a maturação normais do epitélio escamoso imaturo em maduro, são interrompidas como resultado da expressão de oncoproteínas *E6/E7* e da perda do controle de crescimento normal (revisão em DOORBAR, 2005). Durante a infecção pelo vírus do papiloma, as proteínas *E6* e *E7* de HPVs de alto risco são expressas, a parada do ciclo celular é abolida, mantendo a progressão do ciclo celular e retardando a diferenciação terminal normal (DOORBAR, 2005).

A infecção persistente por HPVs de alto-risco pode resultar na integração do DNA viral no genoma das células do hospedeiro, e é considerada um dos principais fatores de risco no desenvolvimento de lesões cervicais e do câncer cervical (ANDERSSON *et al.*, 2006, MASUMOTO *et al.*, 2003; ARIAS-PULIDO *et al.*, 2006; CHEUNG *et al.*, 2006; SAMAMA *et al.*, 2006).

Acredita-se que o DNA do HPV seja aleatoriamente integrado ao genoma do hospedeiro, durante o processo de reparo desencadeado após o surgimento de quebras na dupla fita de DNA do genoma celular (DOORBAR, 2005). Durante o evento de integração, o

DNA viral é linearizado o que resulta na perda de alguns genes virais, dentre eles o gene *E2*, o que resulta em uma superexpressão dos genes *E6* e *E7*, acelerando assim, o processo de transformação e imortalização celulares (Fig. 9) (IARC, 2005; zur HAUSEN, 2002; ZHENG & BAKER, 2006, TERMINI & VILLA, 2008).



**FIGURA 9: Modelo proposto para a integração do DNA viral (Fonte: DOORBAR, 2005).** No processo de integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, ocorre linearização do genoma viral e possível perda de alguns genes virais, dentre esses o gene *E2*.

## 1.4 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO CONTROLE DO CICLO CELULAR EM NEOPLASIAS CERVICAIS

### 1.4.1 *P16<sup>INK4a</sup>* - Propriedades Gerais

Como mencionado, a proteína *p16<sup>INK4a</sup>* consiste em um dos principais alvos de estudo no desenvolvimento de biomarcadores, que permitem monitorar eventos moleculares associados à progressão tumoral em amostras histológicas e citológicas (DOEBERITZ, 2002; TERMINI & VILLA, 2008). O valor da proteína *p16<sup>INK4a</sup>* como biomarcador de infecção por

HPVs de alto risco e da neoplasia intraepitelial cervical, têm sido estabelecido em anos recentes, com estudos demonstrando tanto um aumento da expressão de p16<sup>INK4a</sup> em células epiteliais cervicais neoplásicas, quanto uma correlação positiva entre a expressão da proteína e, a infecção por HPV e o grau da neoplasia (KALOF *et al.*, 2006).

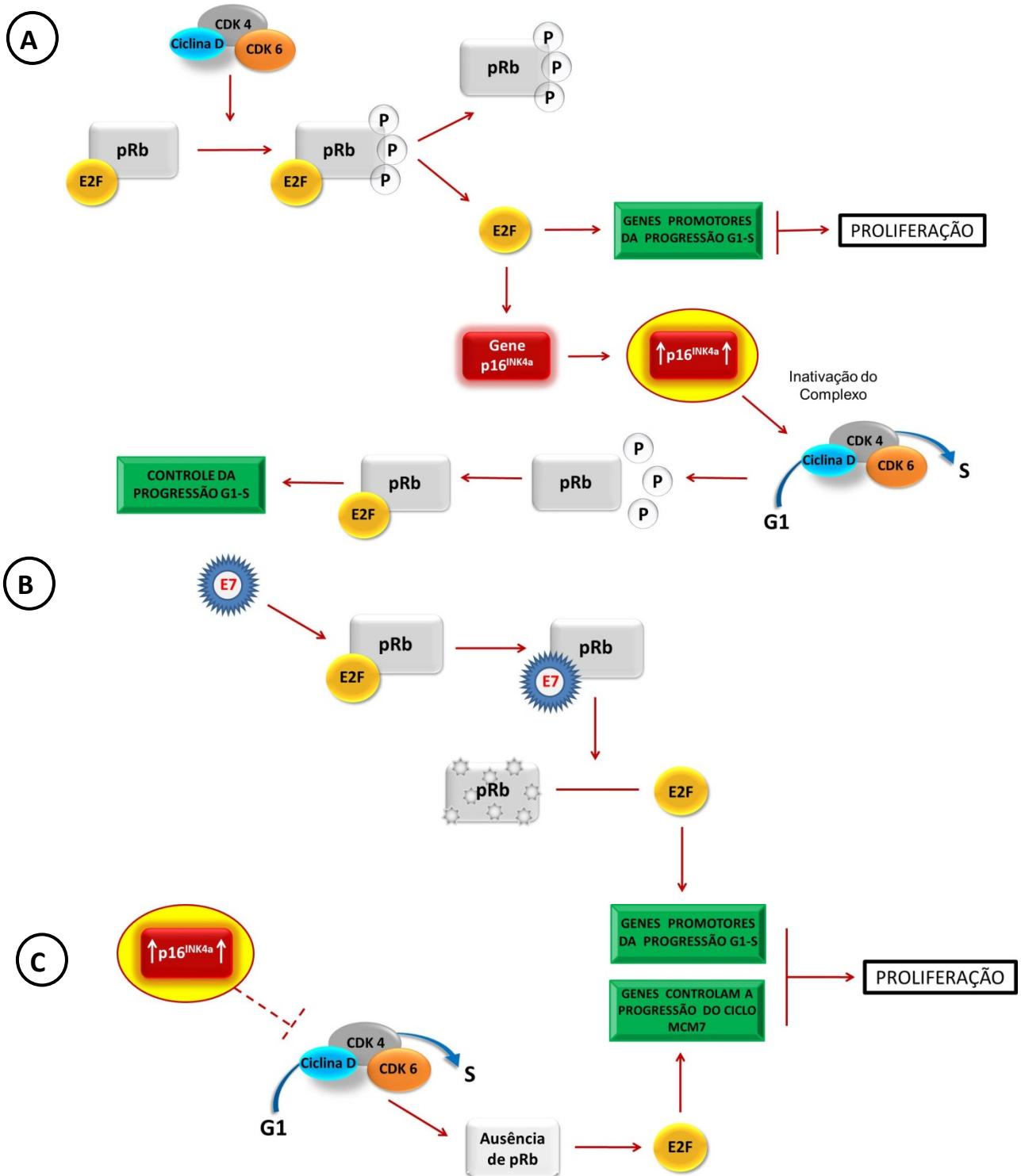
A p16<sup>INK4a</sup> é uma proteína pertencente à família INK4, cujos membros possuem a habilidade de inibir as quinases dependentes de ciclina (CDKs, do inglês *cyclin dependent kinases*) e, que atua na regulação negativa do ciclo celular através do bloqueio da atividade de CDK4 e CDK6 e da interação com a ciclina D1 (Fig. 6A) (SERRANO, 1997). Na ausência de p16<sup>INK4a</sup>, a ciclina D1 se liga e ativa as CDKs 4 e 6, formando o complexo ciclina D1/CDK4-6 que fosforila e inativa a proteína do retinoblastoma (pRb). No estado hipofosforilado, a pRb impede a progressão do ciclo celular ao formar um complexo com o fator de transcrição E2F. Porém, quando fosforilada, pRb dissocia-se de E2F, resultando na ativação da transcrição dos genes-alvo de E2F, promovendo a progressão do ciclo através da transição G1-S. O aumento de p16<sup>INK4a</sup> induz à inativação do complexo ciclina D1/CDK4-6 e ao bloqueio da progressão do ciclo (Fig. 10A) (KIM & ZHAO, 2005).

Como relatado anteriormente, durante a infecção pelo HPV, as oncoproteínas virais E6 e E7 interferem substancialmente nos eventos de apoptose e de regulação do ciclo nas células infectadas (Fig. 6). A proteína E7 de HPVs de alto risco é capaz de interagir e degradar a pRb, induzindo a liberação de E2F (Fig. 10B). A perda de função da pRb por interação com E7 de HPVs de alto risco, parece resultar na liberação do controle da transcrição do gene *p16<sup>INK4a</sup>*, ocasionando um aumento na expressão da proteína p16<sup>INK4a</sup>, como observado em diversos estudos (DOEBERITZ, 2002; MURPHY *et al.*, 2005; KALOF *et al.*, 2005; NAM *et al.*, 2008; THOMISON *et al.*, 2008).

Entretanto, a elevação dos níveis de p16<sup>INK4a</sup> deveria promover uma diminuição da proliferação celular (Fig. 10A), evento não compatível com o fenótipo das células neoplásicas. Duas hipóteses têm sido consideradas para explicar essa aparente contradição. Na primeira dessas hipóteses, considera-se que embora superexpressa, a proteína p16<sup>INK4a</sup> poderia estar inativa em virtude da inativação de pRb, resultando na progressão do ciclo celular (Fig. 10C) (DOEBERITZ, 2002; MURPHY *et al.*, 2005; KALOF *et al.*, 2005; NAM *et al.*, 2008; THOMISON *et al.*, 2008).

Uma segunda hipótese plausível seria a de que, a inativação de pRb pelas proteínas E7 de HPVs de alto risco, poderia ocasionar o aumento da expressão de p16<sup>INK4a</sup>, evento normalmente observado nas neoplasias cervicais. Porém esse aumento seria transitório e, em

um primeiro momento, responsável pela inibição da atividade do complexo ciclina/CDK e, posteriormente, responsável pela limitação dos níveis de p16<sup>INK4a</sup> e pela ativação das CDKs 4/6, com consequente indução dos eventos de proliferação celular. De fato, observou-se um aumento da expressão do RNAm e dos níveis da proteína p16<sup>INK4a</sup> após a imortalização *in-vitro* mediada pelos HPVs 16 e 18, enquanto que esses níveis foram praticamente não detectáveis após a transformação maligna dessas células, sugerindo que uma cascata de eventos de inibição/ inativação de p16<sup>INK4a</sup>, possa ocorrer durante o evento de imortalização mediado pelo HPV (NAKAO *et al.*, 1997).



**FIGURA 10: Modelo da associação da oncoproteína viral E7 de HPVs de alto risco e as proteínas do ciclo celular.** A – Em condições normais, o complexo ciclina/CDK4-6 fosforila a proteína pRb que se dissocia de E2F, promovendo a progressão do ciclo celular. No estado hipofosforilado, pRb impede a progressão do ciclo celular ao formar um complexo com o



fator de transcrição E2F. B – Durante a infecção por HPVs de alto risco, a oncoproteína viral E7 interage e degrada pRb induzindo a liberação do fator de transcrição E2F, que ativa a transcrição de genes responsáveis pela progressão e controle do ciclo através da transição G1-S. C – Embora superexpressa, a proteína p16<sup>INK4a</sup> parece ser funcionalmente inativa e não atua na inibição do complexo ciclina/CDK, e conseqüentemente, no controle do ciclo celular, promovendo a progressão das fases G1-S do ciclo.

#### *1.4.1.1 Expressão de p16<sup>INK4a</sup> em Neoplasias Cervicais*

Diversos estudos têm avaliado o papel de p16<sup>INK4a</sup> como marcador diagnóstico de progressão da neoplasia cervical. No Quadro 2 é apresentada uma relação da maioria desses estudos, e a correlação entre a porcentagem de amostras apresentando forte expressão de p16<sup>INK4a</sup> e o grau da neoplasia cervical. Destaca-se que a totalidade desses trabalhos foi baseada na análise semi-quantitativa de amostras cervicais, avaliada pela técnica de Imunohistoquímica. Ressalta-se ainda, que existe uma variação nos critérios de avaliação e interpretação da marcação da proteína p16<sup>INK4a</sup> entre diferentes trabalhos, como por exemplo a localização da proteína (positividade nuclear e/ou citoplasmática), a porcentagem de células positivas (focal e difusa) e a distribuição da marcação dentro do epitélio (topografia) (revisão em KALOF *et al.*, 2006; TSOUMPOU *et al.*, 2009).

A maioria desses trabalhos apontam ausência de expressão de p16<sup>INK4a</sup> na mucosa cervical normal (KLAES *et al.*, 2001; SANO *et al.*, 2002; MURPHY *et al.*, 2003; BRANCA *et al.*, 2004; VOLGAREVA *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2005; LORENZATO *et al.*, 2005; HU *et al.*, 2005; BAHNASSY *et al.*, 2006; BENEVOLO *et al.*, 2006; BAHNASSY *et al.*, 2007; ELEUTÉRIO JR *et al.*, 2007; LESNIKOVA *et al.*, 2009; WALTS *et al.*, 2009; MISSAOUI *et al.*, 2010; SRIVASTAVA, 2010; UNGUREANU *et al.*, 2010). Entretanto, alguns estudos relatam a detecção de uma leve expressão (5-14%) da proteína p16<sup>INK4a</sup> mesmo em amostras de tecido cervical normal (KEATING *et al.*, 2001; AGOFF *et al.*, 2003; WANG JL *et al.*, 2004; WANG S *et al.*, 2004; ISHIKAWA *et al.*, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2010; OZAKI *et al.*, 2011; ZENG *et al.*, 2011). Em contraste com esses autores, Salcedo e colaboradores (2008) observaram que uma elevada taxa (56%) das amostras normais estudadas apresentava forte expressão de p16<sup>INK4a</sup>.

Em relação à expressão da proteína p16<sup>INK4a</sup> em lesões de alto grau e câncer do colo uterino, os estudos descrevem o aumento da expressão dessa proteína em 60 a 100% das amostras analisadas. A maior variação da expressão da proteína p16<sup>INK4a</sup> é observada no grupo

das lesões de baixo grau, onde a maioria dos trabalhos observam uma positividade para essa proteína em 30 a 50% das amostras (AGOFF *et al.*, 2003; WANG JL *et al.*, 2004; WANG S *et al.*, 2004; KALOF *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2005; LORENZATO *et al.*, 2005; ANDERSSON *et al.*, 2006; BENEVOLO *et al.*, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2006; NAM *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007; OMORI *et al.*, 2007; WALTS *et al.*, 2009; GUPTA *et al.*, 2010; UNGUREANU *et al.*, 2010; OZAKI *et al.*, 2011; REUSCHEBACH *et al.*, 2011). Esses resultados sugerem que apenas uma parte das lesões de baixo grau infectadas pelo HPV, ou seja, aquelas infectadas por HPVs de alto risco, apresentaria a expressão desregulada das oncoproteínas virais, com consequente aumento da expressão de p16<sup>INK4a</sup>. Porém, as lesões negativas para p16<sup>INK4a</sup> poderiam estar infectadas por HPVs de baixo risco ou a expressão das oncoproteínas seria muito baixa ou até mesmo nula neste tipo de lesão.

Muitos estudos foram dedicados a investigar a correlação da expressão de p16<sup>INK4a</sup>, no contexto da infecção pelo Papilomavírus Humano (Quadro 3).

Em síntese, verifica-se na maioria desses estudos, que a distribuição dos HPVs aumenta de acordo com o grau de progressão da neoplasia, o que também pode ser observado em relação à positividade de p16<sup>INK4a</sup>. Vale a pena ressaltar que níveis elevados de p16<sup>INK4a</sup>, também estão associados a lesões positivas para os HPVs de alto risco (TERMINI & VILLA, 2008).

Dessa forma destaca-se que, embora nos últimos 10 anos um grande número de estudos tenha sido direcionado à análise semi-quantitativa da expressão de p16<sup>INK4a</sup> em amostras cervicais, observa-se certa variação na expressão da proteína em diferentes grupos de lesão, e na mucosa normal. Justifica-se assim, o desenvolvimento de estudos que venham realizar a análise quantitativa da expressão de p16<sup>INK4a</sup> em amostras cervicais, associadas a diferentes marcadores no contexto da infecção pelo HPV, investigando-se a participação de HPVs de alto risco oncogênico na expressão dessa proteína reguladora do ciclo celular.

| Referências       | N amostral | % Amostras Positivas para p16* |       |                      |              |
|-------------------|------------|--------------------------------|-------|----------------------|--------------|
|                   |            | Normal                         | NIC 1 | NIC 2 e NIC 3        |              |
| Keating 2001      | 85         | 12%                            | 100%  | NIC 2 e NIC 3 - 100% |              |
| Klaes 2001        | 282        | 0%                             | 61%   | NIC 2 - 100%         | NIC 3 - 100% |
| Sano 2002         | 56         | 0%                             | 100%  | NIC 2 - 88%          | NIC 3 - 100% |
| Agoff 2003        | 432        | 11%                            | 57%   | NIC 2 - 75%          | NIC 3 - 91%  |
| Murphy 2003       | 154        | 0%                             | 92%   | NIC 2 - 73%          | NIC 3 - 91%  |
| Branca 2004       | 292        | 0%                             | 10%   | NIC 2 - 24%          | NIC 3 - 54%  |
| Volgareva 2004    | 197        | 0%                             | 2%    | NIC 2 - 3%           | NIC 3 - 17%  |
| Wang JL 2004      | 38         | 13%                            | 50%   | NIC 2 - 83%          | NIC 3 - 75%  |
| Wang S 2004       | 292        | 5%                             | 36%   | NIC 2 - 63%          | NIC 3 - 100% |
| Yoshida 2004      | 98         | ND                             | 0%    | NIC 2 - 88%          | NIC 3 - 86%  |
| Kalof 2005        | 44         | ND                             | 50%   | NIC 2 e NIC 3 - 100% |              |
| Kim 2005          | 82         | 0%                             | 36%   | NIC 2 e NIC 3 - 63%  |              |
| Lin 2005          | 117        | 0%                             | 90%   | NIC 2 e NIC 3 - 100% |              |
| Lorenzato 2005    | 99         | 0%                             | 52%   | NIC 2 e NIC 3 - 81%  |              |
| Hu 2005           | 161        | 0%                             | 9%    | NIC 2 - 63%          | NIC 3 - 84%  |
| Andersson 2006    | 91         | ND                             | 47%   | NIC 2 - 65%          | NIC 3 - 77%  |
| Bahnassy 2006     | 110        | 0%                             | ND    | NIC 2 - 36%          | NIC 3 - 63%  |
| Benevolo 2006     | 100        | 0%                             | 31%   | NIC 2 - 90%          | NIC 3 - 100% |
| Bulten 2006       | 38         | ND                             | 67%   | NIC 2 - 100%         | NIC 3 - 100% |
| Ishikawa 2006     | 164        | 14%                            | 25%   | NIC 2 - 80%          | NIC 3 - 94%  |
| Queiroz 2006      | 60         | 9%                             | 53%   | NIC 2 - 70%          | NIC 3 - 93%  |
| Queiroz 2006      | 50         | 9%                             | 67%   | NIC 2 - 90%          | NIC 3 - 100% |
| Bahnassy 2007     | 130        | 0%                             | 0%    | NIC 2 - 36%          | NIC 3 - 63%  |
| Eleutério Jr 2007 | 109        | 0%                             | 15%   | NIC 2 e NIC 3 - 85%  |              |
| Nam 2007          | 265        | ND                             | 27%   | NIC 2 - 37%          | NIC 3 - 62%  |
| Omori 2007        | 107        | ND                             | 36%   | NIC 2 - 73%          | NIC 3 - 100% |
| Song 2007         | 49         | ND                             | ND    | NIC 2 - 33%          | NIC 3 - 76%  |
| Yildiz 2007       | 35         | ND                             | 80%   | NIC 2 e NIC 3 - 100% |              |
| Zhang 2007        | 329        | ND                             | 52%   | NIC 2 - 70%          | NIC 3 - 80%  |
| Nam 2008          | 31         | ND                             | 17%   | NIC 2 - 50%          | NIC 3 - 100% |
| Salcedo 2008      | 187        | 56%                            | 92%   | NIC 2 e NIC 3 - 94%  |              |
| Lesnikova 2009    | 806        | 0%                             | 72%   | NIC 2 - 91%          | NIC 3 - 98%  |
| Walts 2009        | 136        | 0%                             | 41%   | NIC 2 e NIC 3 - 98%  |              |
| Gupta 2010        | 100        | 10%                            | 50%   | NIC 2 - 60%          | NIC 3 - 70%  |
| Missaoui 2010     | 87         | 0%                             | 14%   | NIC 2 - 100%         | NIC 3 - 100% |
| Tan 2010          | 201        | ND                             | 25%   | NIC 2 - 43%          | NIC 3 - 96%  |
| Srivastava 2010   | 63         | 0%                             | 80%   | NIC 2 - 100%         | NIC 3 - 100% |
| Ungureanu 2010    | 76         | 0%                             | 41%   | NIC 2 e NIC 3 - 96%  |              |
| Ozaki 2011        | 252        | 11%                            | 44%   | NIC 2 - 98%          | NIC 3 - 100% |
| Reuschebach 2011  | 76         | ND                             | 41%   | NIC 2 e NIC 3 - 96%  |              |
| Zeng 2011         | 191        | 5%                             | 57%   | NIC 2 e NIC 3 - 84%  |              |

**QUADRO 2: Expressão de p16<sup>INK4a</sup> em relação ao grau da neoplasia cervical e em amostras controles.** NIC - Neoplasia Intraepitelial Cervical, ND - Não Determinado.

\*distribuição para marcação difusa, adotando a classificação proposta por Klaes *et al.*, 2001 (> 25% de células marcadas para p16).

| Referências       | N amostral | % Amostras Positivas para o HPV e p16 <sup>INK4a</sup> * |        |                       |                       |             | Técnica utilizada |
|-------------------|------------|--|--------|-----------------------|-----------------------|-------------|-------------------|
|                   |            |  | Normal | NIC 1                 | NIC 2 e NIC 3         |             |                   |
| Keating 2001      | 75         | HPV  | ND     | 90,4%                 | NIC 2 e NIC 3 - 93,5% |             | PCR               |
|                   | 85         | P16  | 12%    | 100%                  | NIC 2 e NIC 3 - 100%  |             | IHQ               |
| Klaes 2001        | 282        | HPV-AR   | 24%    | 32%                   | NIC 2-56,2%           | NIC 3-85%   | PCR-EIA           |
|                   |            | P16  | 0%     | 61%                   | NIC 2-100%            | NIC 3-100%  | IHQ               |
| Sano 2002         | 56         | HPV  | ND     |                       | 100% das NICs         |             | HIS e PCR         |
|                   |            | P16  | 0%     | 100%                  | NIC 2-88%             | NIC 3-100%  | ICQ/IHQ           |
| Agoff 2003        | 432        | HPV-AR   | 52%    | 77%                   | NIC 2-82%             | NIC 3-95%   | PCR               |
|                   |            | HPV-AR   | 40%    | 100%                  | NIC 2-91%             | NIC 3-92%   | CH2               |
|                   |            | P16  | 11%    | 57%                   | NIC 2-75%             | NIC 3-91%   | IHQ               |
| Murphy 2003       | 154        | HPV-AR   | 0%     | 72%                   | NIC 2-82%             | NIC 3-89%   | PCR Real-time     |
|                   |            | P16  | 0%     | 92%                   | NIC 2-73%             | NIC 3-91%   | ICQ               |
| Branca 2004       | 292        | HPV-AR   | 11,1%  |                       | 70,5% das NICs        |             | PCR               |
|                   |            | P16  | 0%     | 10%                   | NIC 2-24%             | NIC 3-54%   | IHQ               |
| Volgareva 2004    | 197        | HPV-AR   | ND     |                       | 100% das NICs         |             | PCR               |
|                   |            | P16  | 0%     | 2%                    | NIC 2-3%              | NIC 3-17%   | ICQ/IHQ           |
| Wang JL 2004      | 38         | HPV  | 75%    |                       | 80% das NICs          |             | PCR               |
|                   |            | P16  | 13%    | 50%                   | NIC 2-83%             | NIC 3-75%   | IHQ               |
| Wang S 2004       | 292        | HPV-AR   | 31%    | 58,7%                 | NIC 2-47,4%           | NIC 3-58%   | PCR               |
|                   |            | P16  | 5%     | 36%                   | NIC 2-63%             | NIC 3-100%  | IHQ               |
| Yoshida 2004      | 98         | HPV  | ND     | 92%                   | NIC 2 e NIC 3 - 94%   |             | PCR               |
|                   |            | P16  | ND     | 0%                    | NIC 2-88%             | NIC 3-86%   | IHQ               |
| Kalof 2005        | 44         | HPV  | ND     | 80%                   | NIC 2 e NIC 3 - 100%  |             | PCR e Dot-Blot    |
|                   |            | P16  | ND     | 50%                   | NIC 2 e NIC 3 - 100%  |             | IHQ               |
| Lorenzato 2005    | 99         | HPV-AR   | 56%    | 93%                   | NIC 2 e NIC 3 - 100%  |             | CH2               |
|                   |            | P16  | 0%     | 52%                   | NIC 2 e NIC 3 - 81%   |             | IHQ               |
| Hu 2005           | 161        | HPV-AR   | 0%     | 40%                   | NIC 2-72%             | NIC 3-75%   | PCR               |
|                   |            | P16  | 0%     | 9%                    | NIC 2-63%             | NIC 3-84%   | IHQ               |
| Benevolo 2006     | 100        | HPV-AR   | 7%     | 39,5%                 | NIC 2-100%            | NIC 3-100%  | PCR e Dot-Blot    |
|                   |            | P16  | 0%     | 31%                   | NIC 2-90%             | NIC 3-100%  | IHQ               |
| Ishikawa 2006     | 164        | HPV-AR   | ND     | 69,8%                 | NIC 2-97,5%           | NIC 3-91,7% | PCR               |
|                   |            | P16  | 14%    | 25%                   | NIC 2-80%             | NIC 3-94%   | IHQ               |
| Queiroz 2006      | 60         | HPV  | 49,5%  | 86,6%                 | NIC 2-100%            | NIC 3-86,6% | PCR               |
|                   |            | P16  | 9%     | 53%                   | NIC 2-70%             | NIC 3-93%   | IHQ               |
| Queiroz 2006      | 50         | HPV  |        | 41% de todos os casos |                       |             | PCR               |
|                   |            | P16  | 9%     | 67%                   | NIC 2-90%             | NIC 3-100%  | IHQ               |
| Bahnassy 2007     | 130        | HPV  | 0%     |                       | 100% das NICs         |             | PCR               |
|                   |            | P16  | 0%     | ND                    | NIC 2-36%             | NIC 3-63%   | IHQ               |
| Eleutério Jr 2007 | 109        | HPV-AR   | 29,8%  | 80,8%                 | NIC 2 e NIC 3 - 96,1% |             | CH                |
|                   |            | P16  | 0%     | 15%                   | NIC 2 e NIC 3 - 85%   |             | IHQ               |
| Yildiz 2007       | 35         | HPV-AR   | ND     | 26,6%                 | NIC 2 e NIC 3 - 35%   |             | IHQ               |

|                |     |        |     |       |                      |             |                    |
|----------------|-----|--------|-----|-------|----------------------|-------------|--------------------|
|                |     | P16    | ND  | 80%   | NIC 2 e NIC 3 - 100% |             | IHQ                |
| Nam 2008       | 31  | HPV-AR | ND  | 45,5% | NIC 2-83,3%          | NIC 3-84,6% | OMA e CH2          |
|                |     | P16    | ND  | 17%   | NIC 2-50%            | NIC 3-100%  | IHQ                |
| Missaoui 2010  | 87  | HPV-AR | 0%  | 33%   | NIC 2-80%            | NIC 3-78,6% | PCR                |
|                |     | P16    | 0%  | 14%   | NIC 2-100%           | NIC 3-100%  | IHQ                |
| Ungureanu 2010 | 76  | HPV-AR | 25% | 78,1% | NIC 2 e NIC 3 - 100% |             | CH2 e Linear array |
|                |     | P16    | 0%  | 41%   | NIC 2 e NIC 3 - 96%  |             | ICQ                |
| Ozaki 2011     | 252 | HPV-AR | ND  | 69%   | NIC 2-95%            | NIC 3-100%  | CH2                |
|                |     | P16    | 11% | 44%   | NIC 2-98%            | NIC 3-100%  | IHQ                |

**QUADRO 3: Positividade para o HPV e expressão de p16<sup>INK4a</sup> em relação ao grau da neoplasia cervical e em amostras controles.** HPV-AR - HPV de alto risco, NIC - Neoplasia Intraepitelial Cervical, ND - Não Determinado, OMA - *Oligonucleotide Microarray*, CH - Captura Híbrida, PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase), EIA - *Enzyme immunoassay*, ICQ - Imunocitoquímica, IHQ - Imunohistoquímica. \*distribuição para marcação difusa, adotando a classificação proposta por Klaes *et al.*, 2001 (> 25% de células marcadas para p16).

#### 1.4.2 Ki-67 - Propriedades Gerais

A proteína Ki-67, isolada e caracterizada há aproximadamente 25 anos atrás, se tornou nos dias de hoje, um dos principais marcadores histológicos de proliferação. Codificada por um gene de quase 30 Kb, a proteína Ki-67 apresenta 395 Kda. Essa proteína sofre eventos de fosforilação e desfosforilação durante a mitose, é suscetível à ação de proteases e apresenta uma estrutura compatível com o fato de que sua expressão possa ser regulada por vias proteolíticas. Ki-67 também compartilha similaridades estruturais com outras proteínas envolvidas no ciclo celular, que apresentam o domínio FHA (*forkhead-associated*) (ENDL & GERDES, 2000; BROWN & GATTER, 2002, BUBÁN *et al.*, 2009). A expressão de Ki-67 parece ser altamente controlada por sistemas precisos de síntese e degradação, possivelmente envolvendo a ação de proteossomas (SCHLÜTER *et al.*, 1993; BROWN & GATTER, 2002).

A proteína Ki-67 apresenta um padrão de localização nuclear complexo e específico, que sofre mudanças durante as fases do ciclo celular. Durante a intérfase, Ki-67 é exclusivamente detectada no interior do núcleo, associada ao nucléolo. Estudos descrevem a associação de Ki-67 com o componente fibrilar denso (CFD) do nucléolo, que consiste em uma das três regiões sub-nucleolares, que contêm uma variedade de proteínas, necessárias à

produção das unidades ribossomais (ENDL & GERDES, 2000). A próxima mudança aparente na distribuição da proteína ocorre durante a prófase, onde Ki-67 dissocia-se do nucléolo e localiza-se na periferia cromossomal. Durante a metáfase e a anáfase, a proteína é encontrada em regiões pericromossomais encobrindo a cromatina condensada. Na telófase, a proteína Ki-67 é novamente localizada nos núcleos recém-formados, originando pequenas estruturas nucleares, que ainda estão presentes na fase G1 recente, quando as células iniciam a reorganização do núcleo e demais estruturas nucleolares. A relocação da proteína Ki-67 da periferia cromossomal para o nucléolo, ainda é tema de discussão (ENDL & GERDES, 2000; BROWN & GATTER, 2002).

Ao contrário da vasta informação disponível sobre a estrutura, padrão de localização e regulação de Ki-67, pouco se sabe sobre a exata função desta proteína. Diversos pesquisadores têm especulado sobre suas possíveis funções. A proteína parece ser essencial para a proliferação celular, pois estudos de inativação de Ki-67 por meio de experimentos de *knock-down* resultaram na supressão da proliferação celular (SCHLÜTER *et al.*, 1993; SCHOLZEN & GERDES, 2000; BROWN & GATTER, 2002).

A homologia estrutural observada em partes do motivo FHA de Ki-67 com outras proteínas conhecidas por apresentarem um papel na regulação do ciclo celular, sugere um papel similar para Ki-67. Adicionalmente, com base na localização de Ki-67 em sítios extranucleolares durante a fase G1, também sugere-se para essa proteína um papel na organização do DNA. Uma função estrutural para Ki-67 também é proposta, com base na capacidade dessa proteína de interagir com outras proteínas celulares, e de se ligar à moléculas de RNA e DNA (BROWN & GATTER, 2002). Recentemente, também foi sugerido, que Ki-67 poderia atuar como um fator essencial na síntese de ribossomos durante a divisão celular, fato justificado pela sua localização a uma zona do CFD associada ao processamento de RNA ribossomal tardio. Essa hipótese é suportada pela observação, de que a expressão de Ki-67 está associada com a taxa de síntese proteica, função celular sabidamente desempenhada por ribossomos (BULLWINKEL *et al.*, 2006; RAHMANZADEH *et al.*, 2007).

#### *1.4.2.1 Expressão de Ki-67 em Neoplasias Cervicais*

Após ter sido mostrado que a proteína Ki-67 está presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e Mitose), mas não em células quiescentes (G<sub>0</sub>), tornou-se evidente que a detecção da proteína pelo anticorpo Ki-67, poderia ser usada como uma

ferramenta para se estimar a fração de crescimento de qualquer população de células humanas (ENDL & GERDES, 2000; BROWN & GATTER, 2002). Em comparação à contagem de figuras mitóticas, o índice de marcação de Ki-67 é considerado um parâmetro mais sensível para se estimar o número de células em proliferação, por permitir o reconhecimento dessas células durante todas as fases ativas do ciclo. Além disso, a avaliação confiável de figuras mitóticas necessita experiência e consome mais tempo do que a contagem de núcleos corados por Imunohistoquímica (SCHOLZEN & GERDES, 2000).

Em relação à patogênese do câncer cervical, a expressão de Ki-67 em esfregaços cervicais ou em tecidos obtidos por biópsias, tem sido sugerida como um marcador alternativo e específico de progressão. A imunopositividade para Ki-67 parece refletir a relação entre a ação proliferativa, o grau da NIC e a expressão de proteínas do HPV (ANDERSSON *et al.*, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2006).

Assim, a avaliação do número de células positivas para Ki-67 no epitélio representa uma ferramenta auxiliar para o diagnóstico das lesões cervicais, que pode ser usada para distinguir as neoplasias cervicais de lesões cervicais benignas e epitélio normal. Estudos prévios relataram, que a imunoquantificação de Ki-67 também poderia ser útil no diagnóstico para se distinguir os diferentes graus das lesões (KRUSE *et al.*, 2001; SONG *et al.*, 2007). Alguns trabalhos reportam que o uso da imunoquantificação de Ki-67, em complementação a outras técnicas, como a Imunohistoquímica para p16<sup>INK4a</sup> e a hibridização *in situ* (HIS) para o HPV, poderia aumentar a precisão do diagnóstico e reduzir significativamente a variabilidade inter-observador (KALOF *et al.*, 2006; NAM *et al.*, 2009, WALTERS *et al.*, 2009).

Ao realizarem a comparação da distribuição de biomarcadores expressos em neoplasias cervicais, Keating e colaboradores (2001) observaram uma forte relação entre Ki-67 e p16<sup>INK4a</sup> no reconhecimento de lesões cervicais pré-invasivas e associadas ao HPV. Da mesma forma, ao avaliarem a correlação entre a presença do DNA do HPV oncogênico, a expressão de p16<sup>INK4a</sup> e a expressão de Ki-67 em amostras cervicais, Agoff e colaboradores (2003), observam que a expressão de Ki-67 pôde ser considerada um sensível marcador de neoplasia cervical e era associada à presença de HPVs de alto-risco. Em um outro trabalho, ao investigarem a expressão de p16<sup>INK4a</sup> e Ki-67 em relação à carga viral de HPVs de alto-risco, Song e colaboradores (2007) também reportaram que a presença do DNA de HPVs oncogênicos em lesões cervicais estava fortemente associada à alta porcentagem de células positivas para Ki-67, e mais elevada do que o percentual de células marcadas observado em lesões infectadas com HPVs de baixo-risco ou não infectadas. Longatto Filho e colaboradores

(2005) ao quantificar a expressão de p16<sup>INK4a</sup> e Ki-67 em amostras cervicais de mulheres portadoras de HPVs de alto-risco, relataram que a proporção de positividade para p16<sup>INK4a</sup> aumentava de acordo com o grau de positividade para Ki-67. O mesmo foi observado por outros grupos de pesquisadores, onde a expressão de p16<sup>INK4a</sup> e Ki-67 aumentava de acordo com a progressão da lesão cervical (BAHNASSY *et al.*, 2006; NAM *et al.*, 2009; WALTERS *et al.*, 2009).

Entretanto, devido ao fato de que a função de Ki-67 nos eventos proliferação celular permanece obscura, outros marcadores de proliferação celular tem sido investigados na progressão de diversos tipos de neoplasia, incluindo o câncer cervical.

### 1.4.3 MCM7 – Propriedades Gerais

A manutenção da integridade genética de todos os organismos é profundamente dependente da duplicação do DNA de maneira completa e fiel, evento esse iniciado em células eucarióticas, em centenas a milhares de elementos cromossômicos denominados de “origens de replicação” (ORI). Essas sequências direcionam a associação de complexos de multi-proteínas que formarão duas forquilhas de replicação que atuarão em direções opostas em cada origem de replicação (BELL, 1995). As origens mais bem caracterizadas em eucariotas são aquelas presentes em leveduras unicelulares como o *S. cerevisiae*, constituídas por 3 a 4 sequências de 10 a 15pb ricas em nucleotídeos A e T e separadas por 100 a 150pb. Esses segmentos de DNA formam os “elementos A” ou ARS – Sequências de Replicação Autônoma (*Autonomously Replicating Sequence*) que apresentam elevada conservação de sequência, ou os menos conservados “elementos B” (CLYNE & KELLY, 1995). As ORIs de *S. pombe* são separadas por trechos de 800 a 1000pb e constituídas por segmentos de 20 a 50pb também ricos em AT, com menor homologia de sequência do que aquela observada nos elementos ARS de *S. cerevisiae*. As origens de replicação de metazoários são bem menos definidas do que aquelas de leveduras, abrangendo longos trechos de DNA (de até milhares de pares de base) e apresentando pouca homologia de sequência, característica especialmente observada nas ORIs de embriões de *D. melanogaster* e de *Xenopus laevis* (BELL, 1995).



### 1.4.3.1 Componentes e Formação do Complexo Pré - Replicativo

O estabelecimento das forquilhas de replicação bidirecionais, que promoverão a duplicação do DNA durante a fase S do ciclo celular, tem início na formação do Complexo Pré-replicativo (CPR), que consiste na associação ordenada dos fatores de replicação às ORIs durante a fase G1. Dentre os inúmeros fatores de replicação existentes destacam-se os mais bem caracterizados, o complexo de multi-proteínas ORC – Complexo de Reconhecimento da Origem (*Origin Recognition Complex*) (DHAR *et al.*, 2001), as proteínas CDC6 (OEHLMANN *et al.*, 2004) e Cdt1 (MAIORANO *et al.*, 2000) e o complexo MCM – proteínas responsáveis pela Manutenção de Mini-cromossomos (*Minichromosome Maintenance Proteins*) 2-7 (revisão em BELL & DUTTA, 2002; BLOW & DUTTA, 2005). A regulação da formação do CPR corresponde a um ponto chave no controle das vias envolvidas nos eventos de duplicação do DNA e do ciclo celular. Uma vez formado, o CPR sofrerá ativação por pelo menos duas proteínas quinases distintas que irão desencadear a transição desse complexo para o evento de replicação do DNA. De forma semelhante ao observado para o CPR, a formação das forquilhas de replicação envolve a associação ordenada de fatores de replicação adicionais como a proteína MCM10, Cdc 45, RPA (*Replication protein A*), PCNA (*Proliferatin Cell Nuclear Antigen*), RFC (*Replication factor C*) e as sub-unidades  $\epsilon$  e  $\delta$  da DNA Pol (*DNA Polimerase*) (revisão em WAGA & STILLMAN, 1998).

A ORC consiste em um complexo de seis sub-unidades proteicas capaz de reconhecer e se ligar a sequências específicas das origens de replicação de eucariotas, como os elementos ARS das ORIs de *S. cerevisiae*, para subsequente associação dos demais fatores de replicação e início da replicação (ROMANOWSKI *et al.*, 1997). Esse complexo constitui um elemento conservado no evento de replicação de todos os eucariotas estudados, sendo as proteínas constituintes de ORC altamente conservadas em *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *D. melanogaster*, *X. laevis*, entre outros organismos (ROWLES *et al.*, 1996). Além da habilidade de ligação ao DNA, ORC também é capaz de se ligar e hidrolisar o ATP. Porém, uma vez ligado à ORI, o complexo ORC é retido em um estado “ligado ao ATP” necessário à interação com CDC6, de forma que o passo de hidrólise do ATP ocorrerá somente em uma etapa posterior de formação do CPR (CHESNOKOV *et al.*, 2001).

As proteínas CDC6 e Cdt1 constituem elementos adicionais do complexo pré-replicativo (CPR), com função essencial na formação desse complexo. Porém, o mecanismo

envolvido nas funções dessas proteínas na associação dos componentes do CPR permanece não esclarecido (MCGARRY & KIRSCHNER, 1998; TADA *et al.*, 2001). A CDC6 corresponde a um membro da família AAA+ - ATPase da qual também fazem parte as sub-unidades dos complexos ORC e MCM, e apresenta grande homologia de sequência e estrutural com a subunidade Orc1 de ORC (CHESNOKOV *et al.*, 2001; NEUWALD *et al.*, 1996). A proteína CDC6 está funcionalmente envolvida na associação do CPR à ORI; a ligação da proteína requer a associação prévia de ORC à origem de replicação e a hidrólise do ATP, e, por outro lado, a associação dos demais membros do CPR (como as proteínas MCMs), depende da presença de CDC6 ligada à ORI (CHESNOKOV *et al.*, 2001; NEUWALD *et al.*, 1996). Como outros membros do CPR, a Cdt1 é uma proteína altamente conservada entre eucariotas, e consiste em um elemento chave na associação do CPR; a ligação de Cdt1 à cromatina depende da presença do complexo ORC já ligado a esse sítio (YOU *et al.*, 2008). Essa proteína é capaz de se ligar ao domínio C-terminal de CDC6 e de forma cooperativa promover a associação das proteínas MCMs à ORI. Estudos demonstram que a Cdt1 é alvo para a ação da geminina, um fator inibidor da replicação de eucariotas (MCGARRY & KIRSCHNER, 1998; TADA *et al.*, 2001).

Os genes que codificam as proteínas do complexo MCM2-7 foram originalmente identificados em experimentos destinados à procura de proteínas envolvidas no controle da manutenção e em defeitos de segregação de cromossomos, assim como na progressão do ciclo celular (DUTTA & BELL, 1997). Embora as MCMs sejam proteínas altamente homólogas, cada uma das seis sub-unidades (MCM 2 a 7) apresenta uma sequência de aminoácidos específica e bastante conservada entre eucariotas, confirmando a importância biológica e conservação da função dessas proteínas entre os diversos organismos (FEGER *et al.*, 1999; HU *et al.*, 1993; KELLY & BROWN 2000). Estruturalmente, cada MCM possui um domínio C-terminal (com um motivo de ATPase) altamente conservado, que apresenta homologia com a enzima DNA helicase; à semelhança do complexo MCM2-7 essa enzima também forma um complexo hexamérico (FEGER *et al.*, 1999; HU *et al.*, 1993).

Estudos genéticos e bioquímicos fortemente suportam a ideia de que essas proteínas funcionam como um complexo na célula, e de que a associação de MCMs requer a função coordenada de ORC, CDC6 e Cdt1. Sub-complexos contendo diferentes combinações de MCMs já foram purificados, principalmente hexâmeros formados por duas sub-unidades de cada uma das MCMs 4-6-7, indicando que essas sub-unidades atuam independentemente ou em conjunto com as sub-unidades 2, 3 e 5 na função de DNA helicase (revisão em BELL &

DUTTA, 2005; ISHIMI, 1997; REMUS *et al.*, 2009). De fato, estudos demonstram que o sub-complexo formado pelas sub-unidades 4, 6 e 7 apresentam a função de DNA helicase, enquanto que o conjunto das sub-unidades 2, 3 e 5, possivelmente exerça uma função de regulação do complexo MCM4-6-7 (REMUS *et al.*, 2009).

Diferente de outros membros do CPR, as proteínas MCMs atuam tanto nos passos do início quanto da elongação da síntese do DNA. Experimentos de ChIP (*Chromatin Immunoprecipitation* ou Imuno-precipitação de Cromatina) demonstraram que o padrão de associação de algumas MCMs às sequências de DNA da ORI ou próximo dessa, era temporal e bastante similar ao padrão de ligação da DNA Pol replicativa, ou subunidade  $\epsilon$ , à cromatina (TANAKA *et al.*, 1999; ZOU *et al.*, 2000).

Embora esteja claro que as proteínas MCM atuem tanto na ORI quanto na forquilha de replicação, a função exata dessas proteínas nesses sítios permanece sob investigação. Estudos bioquímicos realizados com MCMs de *S. cerevisiae*, *S. pombe* e de camundongo, sugerem que o sub-complexo formado pelas sub-unidades MCM4-6-7 atue na forquilha como uma DNA helicase, uma vez que esse sub-complexo apresentou maior atividade na presença de um substrato que continha extremidades 5' e 3' livres, que são normalmente presentes na forquilha de replicação (LEE & HURWITZ, 2001).

A hipótese anterior é reforçada pela estrutura tridimensional do domínio N-terminal obtida pelas análises por cristalografia de Raios-X e microscopia eletrônica, de complexos de proteínas MCM da archaeobactéria *M. thermoautotrophicum*, recombinantes e purificadas (BREWSTER *et al.*, 2008). As *MtMCMs* formaram um grande complexo multimérico com estrutura de duplo – hexâmero, normalmente encontrado em várias outras DNA helicases replicativas. Na presença de substratos sintéticos em experimentos *in-vitro*, esse complexo apresentou uma atividade de DNA helicase efetiva com processividade de acima de 500pb (LEE & HURWITZ, 2001). Dados obtidos por análise de microscopia eletrônica também mostraram que as proteínas MCM 2-7 de *S. pombe* e de humanos formavam um complexo hetero-hexâmero constituído por uma de cada sub-unidade com estrutura em forma de noz (*doughnutlike*) apresentando um orifício central, provavelmente destinado à passagem da dupla hélice de DNA (ADACHI *et al.*, 1997; BREWSTER *et al.*, 2008).

Enquanto que a função de DNA helicase do sub-complexo MCM4-6-7 parece ser independente das sub-unidades MCM 2-3-5, a atividade de ATPase desempenhada pelo complexo MCM2-7 depende da presença de todas as seis sub-unidades formando o hexâmero completo (PROKHORVA & BLOW, 2000). Mutações no sítio de ligação ao ATP que é

conservado entre todas as MCMs, reduz significativamente a atividade de ATPase do complexo MCM2-7, indicando que a hidrólise do ATP é um evento coordenado entre todas as seis sub-unidades (LABIB *et al.*, 2000; SHECHTER *et al.*, 2004). De forma interessante, experimentos bioquímicos mostraram que as sub-unidades de MCM atuam funcionalmente em pares específicos (MCM 2 e 5, 4 e 7, 3 e 6), de acordo com um modelo proposto e já estabelecido para outras ATPases conhecidas como a F0F1 ATPase e a T7 DNA helicase, que consiste no “modelos de pares catalíticos” (SCHWACHA & BELL, 2001).

#### *1.4.3.2 Atividade de Licenciamento à Duplicação do DNA - “DNA Licensing”*

A acurácia da duplicação do genoma, evento que antecede a cada etapa da divisão celular é um aspecto primordial na manutenção da integridade genômica de cada espécie, e particularmente importante para os organismos multicelulares. Esse evento depende que o genoma inteiro seja duplicado e segregado precisamente para as células filhas. Milhares de origens de replicação ( $10^3$  a  $10^5$ ) são utilizadas por eucariotas para permitir que o genoma seja completamente replicado, de modo que o uso das ORI seja extremamente regulado, e permita que o DNA seja replicado apenas uma vez a cada etapa do ciclo celular (revisão em BELL & DUTTA, 2002; BLOW & DUTTA, 2005).

Visando elucidar de que forma a célula distinguiria se segmentos do DNA já haviam sido replicados ou não, experimentos *in-vitro* baseados na análise temporal da utilização das ORI durante a rápida duplicação do DNA em extratos de ovos de *Xenopus*, descobriram que ao final da fase G1, essas origens se encontravam em um estado “licenciado” para a replicação, que era convertido para um estado “não licenciado” imediatamente após o término da fase S (GILLESPIE *et al.*, 2001). Assim, um modelo de “licenciamento” da duplicação do DNA foi proposto, que é dividido em quatro aspectos principais: (i) as ORI são “licenciadas” por complexos de MCMs (2 a 7) que se ligam a essas origens durante a fase G1; (ii) a ligação do complexo MCM2-7 às ORIs é essencial para que essas se tornem hábeis a formar duas forquilhas de replicação, e então, “licenciadas” à duplicação do DNA; (iii) a ligação do complexo MCM2-7 às ORIs e o “licenciamento” dessas origens são restritos ao final da fase M e à totalidade da fase G1 do ciclo celular; (iv) as MCMs (2 a 7) são deslocadas das ORI logo após o início da duplicação, provavelmente por trabalharem à frente da forquilha de replicação (BLOW & HODGSON, 2002; BLOW & DUTTA, 2005). Portanto, o evento de

“licenciamento” para a duplicação do DNA nunca está temporalmente associado com o DNA já replicado (BLOW & DUTTA, 2005).

Destaca-se que, em extratos de ovos de *Xenopus* apenas os hetero-hexâmeros que continham os seis tipos de MCMs apresentavam atividade de “licenciamento” do DNA (GILLESPIE *et al.*, 2001). Como já relatado, a função das MCMs parece ser necessária não só para o estabelecimento da forquilha de replicação, mas também para a progressão dessa forquilha, uma vez que experimentos de ChIP revelaram que as MCMs se mantiveram associadas às forquilhas à medida que essas atuavam na síntese de DNA cromossomal (SCHWACHA & BELL, 2001). Além disso, a inibição da função do complexo MCM2-7 durante a fase S causava uma rápida interrupção da síntese do DNA (APARÍCIO *et al.*, 1997). Essas observações sugerem que o complexo MCM2-7 funcionaria como uma DNA helicase, responsável pelo desenrolamento da dupla hélice à frente da forquilha de replicação, e que seria removido do DNA pelo próprio movimento dessa forquilha. O deslocamento do complexo MCM2-7 (ou fator de “licenciamento”) do DNA recém-replicado é considerado o aspecto central do modelo de “licenciamento” da duplicação do DNA (BLOW & DUTTA, 2005).

A análise de cristalografia por Raios-X do domínio N-terminal de MCMs da archaeobactéria *M. thermoautotrophicum* descrito anteriormente, revelou uma estrutura em forma de noz com um canal central carregado positivamente (ADACHI *et al.*, 1997; FLETCHER *et al.*, 2003). Essa estrutura é compatível com a função de “licenciamento” do DNA das proteínas MCM, uma vez que por meio dela, o complexo MCM2-7 se ligaria de maneira estável e regulada à dupla fita de DNA no final da fase M e durante a fase G1, sendo esse complexo deslocado das origens licenciadas à medida que a duplicação do DNA prosseguisse na fase S (BLOW & DUTTA, 2005; REMUS *et al.*, 2009).

Portanto, visando impedir que as origens replicadas tornem-se novamente “licenciadas” durante a fase de duplicação do DNA, a atividade do complexo MCM2-7 em “licenciar” novas ORI, é efetivamente regulada antes da entrada da fase S do ciclo. Em leveduras como *S. cerevisiae* e *S. pombe* a atividade desse complexo é regulada indiretamente pelo controle da expressão de CDKs, que são quinases diretamente responsáveis pela ativação das proteínas CDC6 e ORC. Assim, os níveis de CDK se encontram baixos no final da fase M e início da fase G1 e elevados no início da fase G2 (revisão em DIFFLEY, 1996). Entretanto, o papel das CDKs em inibir o sistema de “licenciamento” do DNA em metazoários é menos claro, e parece afetar só indiretamente a ação do complexo MCM2-7 (BELL & DUTTA,

2002; BLOW & DUTTA, 2005). De fato, um dos principais mecanismos de controle desse complexo em seres pluricelulares é por meio da regulação negativa da atividade de Cdt1, mediado pela geminina, proteína inibidora da replicação, responsável pela degradação de Cdt1 no final da fase G1 e início da fase S, via ativação de uma proteína “ubiquitina ligase” da classe SCF (TADA *et al.*, 2001; WOHLSCHLEGEL *et al.*, 2000).

#### *1.4.3.3 Proteínas MCM como Marcadores de Proliferação Celular*

A capacidade proliferativa de células tumorais é um aspecto fundamental de tumores em progressão e em crescimento. Dessa forma, a medida da estimativa da proliferação celular oferece aos patologistas e clínicos informações mais objetivas para o diagnóstico e prognóstico das neoplasias (HALL & LEVISON, 1990; QUINN & WRIGHT, 1990). Existem muitas maneiras de se aferir os níveis de proliferação celular em tecidos processados, mas a técnica de escolha para esse fim consiste na análise Imunohistoquímica de marcadores de proliferação como PCNA e Ki67 (FREEMAN *et al.*, 1999; KEATING *et al.*, 2001; AGOFF *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2005; NISHIHARA *et al.*, 2008). PCNA é uma proteína nuclear de 36 Kda, que age como fator auxiliar da DNA Pol  $\alpha$ , e, portanto, também está envolvida no mecanismo de reparo do DNA, além de atuar na função de replicação dessa molécula (HALL & LEVISON, 1990).

Como já destacado, Ki67 é um marcador geral de proliferação usado amplamente para caracterizar lesões malignas, de forma que numerosos estudos demonstraram uma correlação, entre a expressão de Ki67 e a fração de células em proliferação nessas lesões (BURGER *et al.*, 1986; BROWN & GATTER, 1990). Considerando a expressão desse antígeno em lesões cervicais, o grau de positividade para Ki67 está associado à severidade das lesões cervicais: o número de células positivas e o avanço da imunomarcagem em camadas superiores do epitélio, aumentam com o grau de severidade da displasia cervical (AGOFF *et al.*, 2003; BAHNASSY *et al.*, 2006; KEATING *et al.*, 2001; NAM *et al.*, 2009; WALTZ *et al.*, 2009).

Entretanto, a especificidade de Ki67 em avaliar a proliferação celular é considerada baixa, uma vez que a expressão dessa proteína em amostras cervicais apresentou correlação com a presença de inflamação, sendo verificada elevada expressão de Ki67 em células sob proliferação de lesões atípicas (como ASCUS) e reativas (AGOFF *et al.*, 2003). Além disso, estudos sugerem que a função de Ki67 não está diretamente relacionada à proliferação celular, mas sim com a biossíntese de ribossomos (MACCALLUM & HALL, 2000; SCHOLZEN &

GERDES, 2000). Dessa forma, a análise de marcadores diretamente envolvidos com a replicação do DNA, pode representar uma maneira mais precisa para se avaliar a capacidade proliferativa de células displásicas e neoplásicas.

Recentemente, diversos estudos foram dedicados à avaliação de proteínas MCM como marcadores de proliferação em células e tecidos humanos, com base no fato de que a expressão dessas proteínas é frequentemente demonstrada em células sob proliferação, mas não em células em estado de quiescência, senescência ou diferenciação (FUJITA *et al.*, 1996), sugerindo que as MCMs poderiam ser moléculas úteis como marcadores de proliferação (HIRAIWA *et al.*, 1997; WILLIAMS *et al.*, 1998).

Considerando os trabalhos que avaliaram a expressão de proteínas MCM em linhagens celulares, destaca-se aquele desenvolvido por Ishimi e colaboradores que realizaram uma comparação entre a expressão de MCM2-7 em linhagens celulares transformadas por vírus de primatas – SV40 ou derivadas de câncer da cérvix uterina, com a expressão dessas proteínas provenientes de linhagens de fibroblastos normais humanos - WI-38. Verificou-se maior expressão de MCMs nas linhagens transformadas ou cancerosas, do que naquela correspondente a fibroblastos normais, mesmo considerando-se que todas as linhagens (transformadas ou normais) são obtidas de células previamente imortalizadas (ISHIMI *et al.*, 2003). Esses autores postularam, que os níveis elevados de MCMs em linhagens transformadas, poderiam contribuir ao crescimento de células cancerosas por possivelmente facilitar a replicação do DNA. Da mesma forma, níveis elevados das proteínas MCM2 e 7 foram observados em cinco diferentes linhagens de células de carcinoma colorretal - Colo201, Colo320, DLD-1, LoVo and WiDr (NISHIHARA *et al.*, 2008). Kim e colaboradores (2010) também verificaram níveis aumentados de MCM7 em linhagens celulares de Colangiocarcinoma humano, que haviam sido tratadas com o carcinogênico envolvido no desenvolvimento dessa modalidade de câncer, o produto de excreção do helminto *Clonorchis sinensis* (KIM *et al.*, 2010).

Vários trabalhos foram dedicados à avaliação de proteínas MCMs em tecidos obtidos de tumores humanos, com destaque à análise de **MCM2** (TODOROV *et al.*, 1998; WILLIAMS *et al.*, 1998; MENG *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2006; SHROYER *et al.*, 2006; MUKHERJEE *et al.*, 2007; TORRES-RENDON *et al.*, 2009), **MCM5** (WILLIAMS *et al.*, 1998; STOEBER *et al.*, 1999; MUKHERJEE *et al.*, 2007) e **MCM7** (HIRAIWA *et al.*, 1997; FREEMAN *et al.*, 1999; BRAKE *et al.*, 2003; PADMANABHAN *et al.*, 2004; LI *et al.*,

2005; NISHIHARA *et al.*, 2008; FUJIOKA *et al.*, 2009; GAMBICHER *et al.*, 2009; TAMURA *et al.*, 2010).

A imunexpressão de MCM7 foi analisada em 100 amostras de tecido normal *versus* 20 tecidos neoplásicos, provenientes de diversos sítios anatômicos com exceção da cérvix uterina. Observou-se que a expressão de MCM7 foi intimamente relacionada com a taxa de proliferação de cada tecido (normal ou neoplásico), com níveis aumentados dessa proteína em tecidos que exibiam altas taxas de proliferação (HIRAIWA *et al.*, 1997). Além disso, uma maior expressão de MCM7 foi observada em tumores em comparação ao tecido normal correspondente, e considerando a progressão do carcinoma de pele, níveis crescentes de MCM7 foram verificados em estágios progressivos do epitélio normal em direção ao carcinoma de células escamosas da pele (HIRAIWA *et al.*, 1997).

Em um outro estudo, a análise da expressão de três proteínas MCM, 2, 5 e 7 foi empregada para verificar o *status* proliferativo de 204 amostras de tecido humano incluindo 48 amostras da cérvix uterina (13 amostras de tecido normal, 08 de NIC I, 21 de NIC III e 06 de câncer) (FREEMAN *et al.*, 1999). Uma maior expressão das MCMs 2 e 5 foi observada em lesões de alto grau em comparação àquelas de baixo grau e tecido normal. Porém a análise de MCM7 na progressão de lesões cervicais não foi avaliada nesse trabalho (FREEMAN *et al.*, 1999), e nem em um estudo prévio desenvolvido pelo mesmo grupo (WILLIAMS *et al.*, 1998).

Considerando os trabalhos que avaliaram a expressão de MCM7 como marcador de proliferação, destacam-se aqueles que utilizaram essa proteína como indicadores de proliferação em diversos tipos de neoplasias como neuroblastoma (TSAI *et al.*, 2004), câncer de cólon (NISHIHARA *et al.*, 2008), próstata (PADMANABHAN *et al.*, 2004; REN *et al.*, 2006; LAITINEN *et al.*, 2008), endometrial (LI *et al.*, 2005), oral (FENG *et al.*, 2008; TAMURA *et al.*, 2010) e cervical (BRAKE *et al.*, 2003).

Poucos estudos investigaram a expressão de MCM7 em amostras de tecido da cérvix uterina obtidas de pacientes humanos (FREEMAN *et al.*, 1999; BRAKE *et al.*, 2003) ou do modelo experimental (BRAKE *et al.*, 2003; HONEYCUT *et al.*, 2006). Entretanto, nenhum dos trabalhos anteriores realizou uma análise comparativa entre a expressão de MCM7 e aquela proveniente dos dois marcadores mais comumente utilizados em estudos de progressão de lesões intraepiteliais da cérvix uterina, p16<sup>INK4a</sup> e Ki67.



## **2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA**

---

O câncer do colo do útero corresponde à neoplasia mais comum entre as mulheres em todo o mundo, e o segundo tipo clinicamente mais relevante em termos de incidência e mortalidade. Diversos estudos epidemiológicos e moleculares apontam que a infecção persistente por HPVs de alto-risco constitui o fator de risco mais importante para o desenvolvimento dessa neoplasia, sendo o DNA do HPV detectado em quase 100% das amostras de câncer cervical.

Destaca-se que nos últimos 40 anos uma significativa redução das taxas de prevalência e mortalidade do câncer cervical foi observada, em virtude da implementação de programas de rastreamento das lesões precursoras, principalmente baseados na utilização do teste de Papanicolaou, em especial nos países com programas de triagem bem estruturados. Contudo, mesmo nesses países, um número substancial de casos de câncer cervical ainda ocorre anualmente. Além disso, as técnicas de diagnóstico citopatológico as quais se baseiam na análise de alterações citológicas em esfregaços cervicais, apresentam limitações, que podem levar à geração de resultados falso negativos e falso positivos, atribuídos à variação inter – observador, aos erros de amostragem, à má interpretação de células cervicais anormais ou de células inflamatórias e hiperplásicas. Essas limitações podem acarretar uma deficiência na identificação de mulheres portadoras de lesão associada aos resultados falso-negativos, além da adoção de medidas de tratamento invasivas e, muitas vezes desnecessárias, relacionada aos resultados falso-positivos. Até mesmo o método histopatológico, considerado o método mais confiável para o diagnóstico definitivo das lesões cervicais, também é afetado por certa taxa de variação inter – observador.

Os fatores acima expostos destacam a necessidade de desenvolvimento de biomarcadores celulares sensíveis e específicos, que possam tanto implementar a eficácia dos programas de rastreamento, quanto contribuir à padronização e controle de qualidade dos métodos de diagnóstico citológico e histopatológico. Inúmeros estudos apontam para a evidência, de que a infecção por HPV é acompanhada por mudanças na função ou nível de expressão de genes do hospedeiro. Assim, os biomarcadores consistem em moléculas cuja variação na expressão permite a identificação de alterações e transformações celulares relacionadas e/ou decorrentes da infecção produtiva pelo HPV, e ainda, na identificação de lesões com maior risco de progressão maligna.

Vários marcadores celulares, principalmente detectados por Imunohistoquímica, têm sido avaliados com respeito à sua sensibilidade, sua especificidade e capacidade de detecção

de células displásicas, tanto em biópsias quanto em esfregaços cervicais. Esses incluem antígenos de proliferação, proteínas regulatórias do ciclo celular, proteínas envolvidas na duplicação do DNA celular e proteínas associadas às vias de sinalização.

Dentre esses, destacam-se a proteína supressora de tumor p16<sup>INK4a</sup>, proteína de 15,8 Kd que se liga especificamente às CDK4 e CDK6, inibindo sua atividade de quinase e causando a parada do ciclo celular na fase G1. Da mesma forma, Ki-67 tem sido sugerido como um relevante marcador de proliferação celular no estudo de tumores humanos, uma vez que a sua expressão parece refletir a relação entre a ação proliferativa, o grau da neoplasia e a expressão do Papilomavírus humano. A avaliação de proteínas MCMs como marcadores de proliferação em células e tecidos humanos, tem sido realizada em diversos estudos, sugerindo que as MCMs poderiam ser moléculas úteis como marcadores de proliferação, com base no fato de que a expressão dessas proteínas é frequentemente demonstrada em células em proliferação, mas não em células em estado de quiescência, senescência ou diferenciação.

Visando determinar o potencial de p16<sup>INK4a</sup>, de Ki-67 e de MCM7 como biomarcadores celulares de progressão e a sua relação com a presença da infecção pelo HPV, especificamente de tipos de HPVs de alto-risco, realizaremos, no presente estudo, a análise da expressão dos três marcadores p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7 em amostras cervicais classificadas histopatologicamente em graus subsequentes de progressão neoplásica.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão da proteína reguladora do ciclo celular p16<sup>INK4a</sup>, do antígeno de proliferação Ki-67 e da proteína MCM7 em Lesões Intraepiteliais Cervicais, e a sua correlação com a presença da infecção pelo Papilomavírus Humano e por HPV's de alto-risco.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a área, distribuição e topografia da expressão das proteínas p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7, em amostras cervicais sem alteração histopatológica ou portadoras de graus distintos de Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC I, II, III), por meio da técnica de Imunofluorescência Indireta.
- Avaliar nas amostras cervicais, a correlação entre a expressão dos biomarcadores p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7.
- Investigar nas amostras cervicais analisadas, a presença da infecção pelo HPV e dos tipos de HPV de alto risco (16 e 18) pela técnica da PCR.
- Avaliar nas amostras cervicais, a correlação da infecção pelo HPV e por HPV's de alto risco, e a expressão dos biomarcadores p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7.

### 4.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS CERVICAIS: COLETA, FIXAÇÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Neste trabalho foram analisadas 80 amostras cervicais, obtidas por Cirurgia de Alta Frequência (CAF), e correspondentes à espécimes incluídas em parafina, que foram selecionadas de um banco de amostras do Laboratório de Anatomia Patológica Tafuri, Belo Horizonte, MG, e gentilmente cedidas pelo Dr. Alexandre Tafuri, coordenador do referido laboratório. Destaca-se que tais amostras foram concedidas sob a forma de empréstimo durante o período de realização da pesquisa, ficando sob a guarda provisória do Laboratório de Biologia das Interações Celulares II, do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG, mediante a assinatura de um termo de responsabilidade dos blocos de parafina utilizados no presente estudo. O diagnóstico histopatológico foi independentemente revisado e confirmado por 3 médicos patologistas com larga experiência profissional.

Tais amostras incluíram 24 amostras de mucosa cervical normal sem alteração histopatológica, obtidas de pacientes submetidas à histerectomia, 17 amostras de NIC I, 18 de NIC II e 21 amostras de NIC III.

A prática da coleta amostral para realização de exame histopatológico de rotina foi realizada sob visão colposcópica por médicos ginecologistas. Para realização das Cirurgias de Alta Frequência (CAFs) utilizou-se o aparelho “Wavetronic 2000”, acoplado ao aspirador de fumaça. Após a coleta, as amostras de tecido foram processadas rotineiramente para inclusão em parafina, sendo inicialmente realizada a fixação dos tecidos em formalina a 10%, por 24 horas. Em seguida, os fragmentos foram submetidos à desidratação gradativa em álcool absoluto, posteriormente, à diafanização em xilol e à impregnação e inclusão em parafina, sob temperatura média de 75° C.

Destaca-se que para a realização desse trabalho, foram utilizadas amostras cervicais coletadas no período de 2004 a 2006.

A utilização destas amostras parafinadas para fins de pesquisa havia sido aprovada pelo COEP (Comitê em Ética e Pesquisa) da UFMG, em dois outros estudos anteriores. Para a realização do presente estudo, o projeto de pesquisa foi encaminhado ao COEP – UFMG e se encontra em processo final de análise (Anexo 1, Seção de Anexos).

## 4.2 EXTRAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS CERVICAIS

Dois cortes de 10 µm obtidos de cada amostra cervical foram colocados em um tubo de 1,5 mL (Eppendorf), previamente identificado. No intervalo dos cortes realizados entre blocos correspondentes a amostras distintas, o micrótomo e a navalha foram cuidadosamente limpos com xilol, etanol e solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, nesta ordem, para prevenir a contaminação cruzada entre as amostras (GREER *et al.*, 1991; WRIGHT & MANOS *et al.*, 1990; SHIMIZU & BURNS *et al.*, 1995). Além disso, no intervalo da obtenção de cortes entre amostras distintas, eram obtidos cortes de um bloco contendo apenas parafina, sendo estes considerados os controles negativos da etapa de obtenção dos cortes, para averiguar a presença de possível contaminação cruzada.

Para a extração do DNA das amostras parafinadas, foi utilizado o protocolo de extração descrito por Wright & Manos (1990), com algumas modificações.

Para a etapa de remoção da parafina, os cortes foram imersos em 1 mL de xilol por duas vezes sob rotação, à temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, os tecidos desparafinizados foram lavados em álcool etílico absoluto, com consecutiva centrifugação e desprezo do sobrenadante (SND). Finalmente, foi realizada a lise do tecido, com 450 µL de solução de digestão, contendo 50 mM de Tris-HCl - pH 8,5 (Promega), 1 mM de EDTA (Gibco), 0,5% de Tween 20 (Invitrogen) e 200 µg/mL de proteinase K (Sigma), pela incubação em banho-maria a 37° C por cerca de 16 horas. Após este período, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante (lisado) obtido, transferido para outro tubo Eppendorf para ser utilizado na PCR.

## 4.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

### 4.3.1 Amplificação de um Fragmento do Gene de $\beta$ -Globina

Como controle da integridade do DNA obtido das amostras após extração, foi utilizada a amplificação do gene de beta-globina humana, através da PCR, utilizando os iniciadores PC03 e PC04 (SAIKI *et al.*, 1985), capazes de amplificar um fragmento de 110 pb do gene de  $\beta$ -globina. As condições de preparo da reação e o programa de amplificação utilizado, estão descritos no Anexo 2, Seção de Anexos.

Como controle positivo da amplificação do gene de  $\beta$ -globina humano, foram utilizadas amostras de DNA extraídas de sangue, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Genética Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG. O controle negativo da PCR, consistiu no produto da reação correspondente à mistura de todos componentes da reação (dNTP's, íon magnésio, iniciadores e *Taq* DNA polimerase), sem a adição de qualquer amostra de DNA.

#### 4.3.2 Detecção da Infecção por HPV e Tipagem

##### 4.3.2.1 Detecção do Genoma Viral

As amostras de DNA extraídas foram submetidas à PCR com os iniciadores genéricos para os HPVs - GP5 e GP6+ (MOLIJN *et al.*, 2005), capazes de amplificar um fragmento de 150 pb do gene *L1* de diversos tipos de HPV. As condições de preparo da reação, assim como o programa de amplificação da PCR estão descritos no Anexo 2, Seção de Anexos.

Como controle positivo da PCR para o HPV foi utilizado o DNA extraído de células HeLa, que possuem o DNA do HPV 18 integrado ao seu genoma. O controle negativo da PCR, consistiu no produto da reação, sem a adição de qualquer amostra de DNA.

##### 4.3.2.2 Tipagem dos HPVs

Após a identificação das amostras positivas para o DNA do HPV, foi realizada nessas amostras a tipagem dos HPVs de alto risco 16 e 18.

A tipagem dos HPVs 16 e 18 foi realizada por meio de um protocolo *hemi-nested* PCR, utilizando-se os iniciadores genéricos E6CF4 e E7CR3, complementares aos genes *E6* e *E7*, para a amplificação de um primeiro fragmento de tamanho variável (350 a 390 pb), de acordo com o tipo de HPV (YAMAGUCHI *et al.*, 2002). Em seguida foi realizada uma segunda reação de amplificação, utilizando-se como DNA molde o produto obtido na primeira reação, o iniciador reverso E7CR3 e os iniciadores diretos, HPV16F e HPV18F (YAMAGUCHI *et al.*, 2002).

Os protocolos de amplificação empregados (condições de preparo da reação e programa de amplificação) estão descritos no Anexo 2, Seção de Anexos.

Como controles positivos da PCR para tipagem dos HPVs foram utilizadas: (i) amostras de DNA do Laboratório de Biologia das Interações Celulares II, do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG, sabidamente portadoras de tipos específicos do HPV; (ii) amostras de DNA extraído de células HeLa, que possuem o DNA do HPV 18 integrado ao seu genoma e (iii) amostras de DNA tipo – específicas gentilmente cedidas pela Dra. Dora Mendez do NUPAD, Núcleo de Apoio e Diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG. Como controle negativo da PCR, foi utilizado o produto da reação sem adição de qualquer amostra de DNA.

Os produtos da PCR obtidos nas reações de amplificação (itens 4.3.1 e 4.3.2) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% por duas horas em tampão TBE 1X (Tris-Borato-EDTA), a uma voltagem constante de 100V. Cinco microlitros de cada produto da PCR foram homogeneizados com 5 µL de tampão de amostra 2X (TBE 5X/ Azul de bromofenol a 0,25%/ Xilenocianol a 0,25%/Ficoll 400 a 15%) e aplicados por canaleta do gel. Após o término da eletroforese, os produtos de interesse foram visualizados nos géis de poliacrilamida, após coloração pela prata (Anexo 3, Seção de Anexos).

#### 4.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Para análise da expressão das proteínas (p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7) foram utilizados os seguintes anticorpos seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante:

**TABELA 1: Especificações dos anticorpos utilizados na técnica de Imunofluorescência Indireta.**

| <b>Anticorpo</b>   | <b>Especificações</b>                                       | <b>Hospedeiro/Tipo</b>             | <b>Marca</b>   | <b>Código</b> |
|--------------------|---|------------------------------------|----------------|---------------|
| <i>Primários</i>   | Anticorpo Anti – p16;<br>clone JC8                          | <i>Mouse</i><br><i>Monoclonal</i>  | LabVision      | MS-889-P1     |
|                    | Anticorpo Anti – Ki67;<br>clone H-300                       | <i>Rabbit</i><br><i>Polyclonal</i> | Santa Cruz     | SC-15402      |
|                    | Anticorpo Anti - MCM7;<br>clone DCS-141                     | <i>Mouse</i><br><i>Monoclonal</i>  | Abcam          | MS-768-P1     |
| <i>Secundários</i> | <i>Biotin-SP-conjugated</i><br><i>AffiniPure anti-mouse</i> | <i>Goat</i>                        | Jackson Immuno | 115-065-146   |
|                    | <i>Cy2-conjugated Streptavidin</i>                          | -                                  | Jackson Immuno | 016-220-084   |
|                    | <i>Cy5-conjugated AffiniPure</i><br><i>anti-rabbit</i>      | <i>Goat</i>                        | Jackson Immuno | 111-175-144   |
|                    | <i>Cy5-conjugated Streptavidin</i>                          | -                                  | Jackson Immuno | 016-170-084   |

A marcação dos núcleos foi feita com Iodeto de Propídeo:

| <b>Especificações</b> | <b>Marca</b>     | <b>Código</b> |
|-----------------------|------------------|---------------|
| Iodeto de Propídeo    | Molecular Probes | P1304MP       |

As imagens obtidas pela técnica de Imunofluorescência foram capturadas por meio de microscópio confocal à laser (*Zeiss LSM 510 Meta*), utilizando-se o programa *Carl Zeiss - Laser Scanning Microscope (LSM) 510 Meta* (versão 3.2). Para a detecção da fluorescência gerada pelos anticorpos secundários marcados com Cy2 e Cy5, e do iodeto de propídeo, foram utilizados os lasers 488, 633 e 543, que emitem fluorescência nas cores verde, infravermelho (representada pela cor branco) e vermelho, respectivamente.

Essa etapa do trabalho foi realizada em colaboração com o Prof. Gregory Thomas Kitten, do Laboratório de Desenvolvimento do Coração e Matriz Extracelular do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG.

#### *4.4.1 Dupla Marcação com os anticorpos anti-p16 e anti-Ki67*

Cortes parafinados de 7 µm obtidos das amostras cervicais e dispostos sobre lâminas silanizadas, foram desparafinizados em 4 banhos de xilol por 10 minutos e reidratados através da passagem por uma série graduada de etanol (100-70%). Para aumentar a possibilidade de detecção das proteínas sob análise, foi realizada a recuperação antigênica, onde os cortes foram imersos em solução de citrato de sódio 1,92 g/L pH 6,0, e aquecidos a 100° C em banho-maria durante 30 minutos. Após o resfriamento, os cortes passaram por uma etapa de bloqueio com solução de BSA (*Bovine Serum Albumin*) a 2% em PBS (*Phosphate-Buffered Saline*), à temperatura ambiente durante 60 minutos. Posteriormente, os cortes foram incubados a 4°C por 18 horas, em uma única solução contendo os dois anticorpos primários, anti-p16 e anti-Ki67, às diluições de 1:800 e 1:100, respectivamente. Após a lavagem com PBS, os cortes foram incubados com Biotina-SP *anti-mouse*, a uma diluição de 1:200, à temperatura ambiente por 60 minutos. Realizou-se novamente a lavagem das lâminas em PBS, com posterior incubação dos cortes em uma única solução contendo os dois anticorpos secundários, *Cy2-conjugated Streptavidin* e *Cy5-conjugated anti-rabbit* à diluição de 1:200 cada, para detecção das proteínas p16<sup>INK4a</sup> e Ki-67, respectivamente. Finalmente, a montagem das lâminas foi feita em *Hydromount (National Diagnostics)*.



Para controle negativo de cada reação, foi feita a substituição dos anticorpos primários (anti-p16 e anti-Ki67), pela solução de bloqueio (solução de BSA a 2% em PBS). Como controle positivo para a marcação de p16<sup>INK4a</sup>, em cada experimento, foi utilizada uma amostra de Carcinoma Escamoso Invasor e como controle negativo e interno de cada amostra, foi utilizado o epitélio normal adjacente à área de lesão.

#### 4.4.2 Marcação com o anticorpo anti-MCM7

Para a marcação da proteína MCM7 as etapas de desparafinização, bloqueio e recuperação antigênica foram idênticas às descritas anteriormente. Os cortes foram incubados a 4°C por 18 horas, em solução contendo o anticorpo primário anti-MCM7 à diluição de 1:1000. Após a lavagem em PBS, os cortes foram incubados com Biotina-SP *anti-mouse*, à diluição de 1:200 em temperatura ambiente por 60 minutos. Realizou-se novamente a lavagem das lâminas em PBS, sendo os cortes posteriormente incubados com o anticorpo secundário *Cy5-conjugated Streptavidin* à diluição de 1:200. Finalmente, a montagem das lâminas foi feita em *Hydromount* (*National Diagnostics*).

### 4.5 AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DAS MARCAÇÕES DE P16<sup>INK4a</sup>, KI-67 e MCM7

A imunorreatividade foi avaliada pela área de expressão, topografia e distribuição de células e/ou núcleos positivos para os marcadores p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7. Foram consideradas células positivas para p16<sup>INK4a</sup> aquelas que apresentavam forte expressão nuclear e/ou citoplasmática do anticorpo, enquanto que a positividade para Ki-67 e MCM7 foi baseada na detecção de forte marcação nuclear.

As medidas da área de expressão e do número de células positivas para os marcadores, foram obtidas pelo *software* KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha). Essa etapa do trabalho foi realizada em colaboração com o Prof. Marcelo Vidigal Caliari, do Laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia Geral, ICB, UFMG.

Para aquisição das imagens por meio da microscopia confocal, o epitélio foi visualizado pela objetiva de 40X, sendo digitalizadas imagens de toda a extensão da lesão. De cada imagem foi obtida, em escala quantitativa, a área de expressão dos anticorpos, utilizando-se como padrão, a extensão em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) de todo epitélio lesado.

Um ajuste prévio dos valores da expressão de cada biomarcador obtidos pela análise de amostras cervicais individuais, foi realizado em etapa anterior ao cálculo da expressão média de cada marcador, verificada por grupo de lesão. Considerando a heterogeneidade do tamanho da área de epitélio lesado, observado entre diferentes amostras, realizou-se a correção dos valores médios da expressão de cada marcador, que haviam sido obtidos para cada amostra individual. Assim, esses valores médios de expressão, foram ajustados para a menor área de epitélio lesado verificado entre as 56 amostras de NIC analisadas, correspondente a 33.091,6  $\mu\text{m}^2$ .

Em escala semi-quantitativa, foram analisados (i) a distribuição de células e/ou núcleos positivos e (ii) a topografia da expressão dos marcadores acima relacionados. Para expressão de p16<sup>INK4a</sup>, os resultados foram graduados como: 0, 1+, 2+, 3+ baseados em nenhuma, 5-25%, 25-75%, e >75% de área marcada e de células e/ou núcleos positivos (AGOFF *et al.*, 2003). Para se determinar o grau de marcação de Ki-67 e MCM7, os resultados foram expressos como 1+, 2+, 3+ e 4+ quando a área de expressão e a porcentagem de células positivas foram entre 1-20%, 20-40%, 40-60% e >60%, respectivamente (AGOFF *et al.*, 2003).

A topografia da expressão dos marcadores foi classificada em 1/3, 2/3 e total, quando houve imunorreatividade do terço basal, de dois terços basais e da espessura total do epitélio, respectivamente.

Para o cálculo dos índices de marcação (LI – *labeling index*) de p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7 considera-se a porcentagem do número de núcleos positivos para cada marcador em relação ao número total de núcleos contidos no epitélio lesado (NISHIHARA, *et al.*, 2008).

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

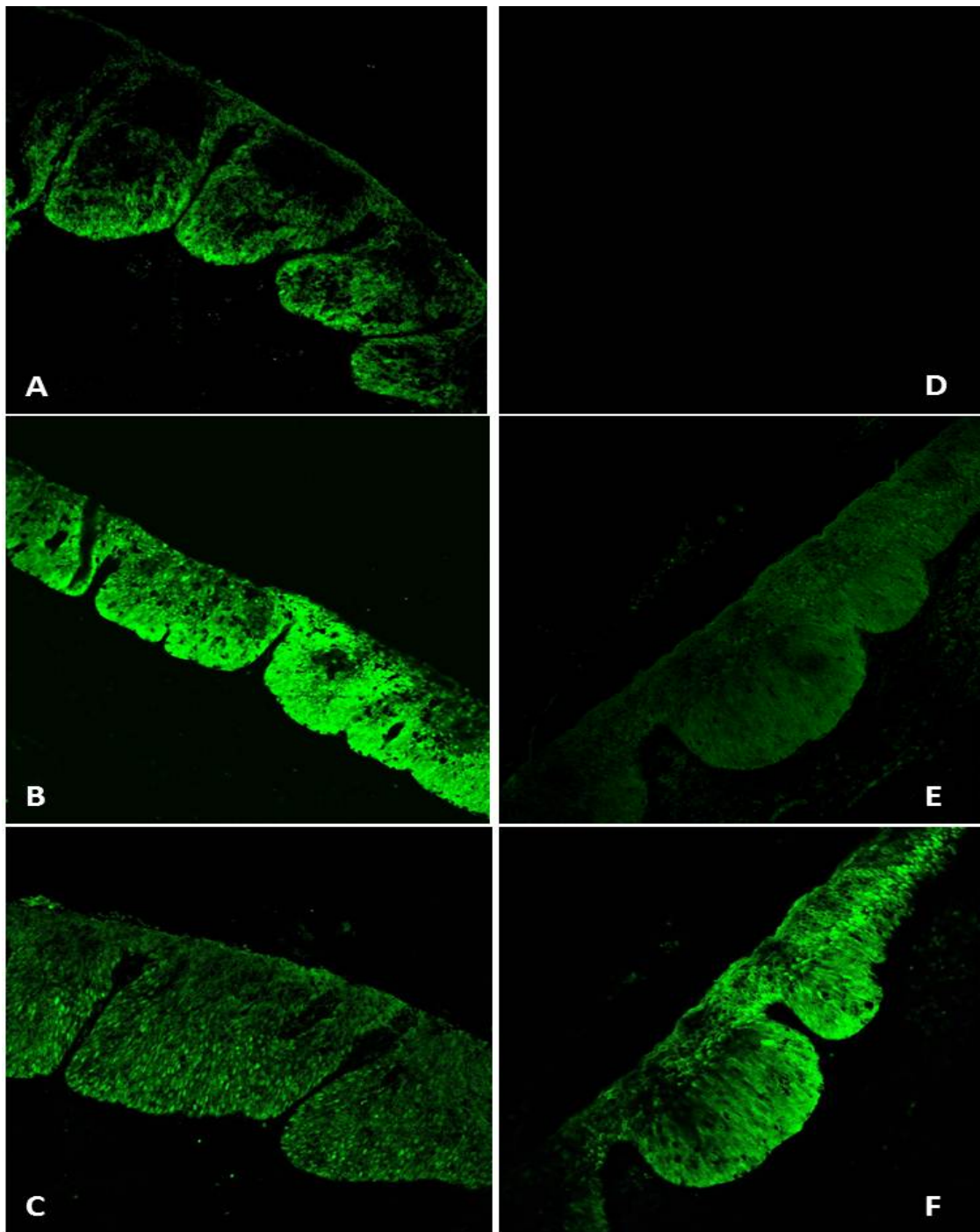
Utilizou-se o Coeficiente de Correlação de Spearman para análise da associação existente entre a expressão dos diferentes biomarcadores p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7, o grau da neoplasia cervical e a presença da infecção pelo HPV. Para realizar uma análise comparativa entre a expressão desses biomarcadores, utilizou-se o Coeficiente de Correlação de Pearson. Valores de  $P < 0.05$  foram considerados estatisticamente significantes.

**5.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA ANÁLISE DAS PROTEÍNAS P16<sup>INK4a</sup>, KI-67 E MCM7**

Com o objetivo de padronizar-se a técnica de Imunofluorescência para análise da expressão de p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7 em amostras cervicais, diversos experimentos foram realizados, dentre eles: (i) curvas de diluição e tempo de incubação para otimização do uso dos anticorpos primários (anti- p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7); (ii) verificação de possível reação inespecífica entre os anticorpos secundários e (iii) verificação de possível reação cruzada entre os anticorpos primários.

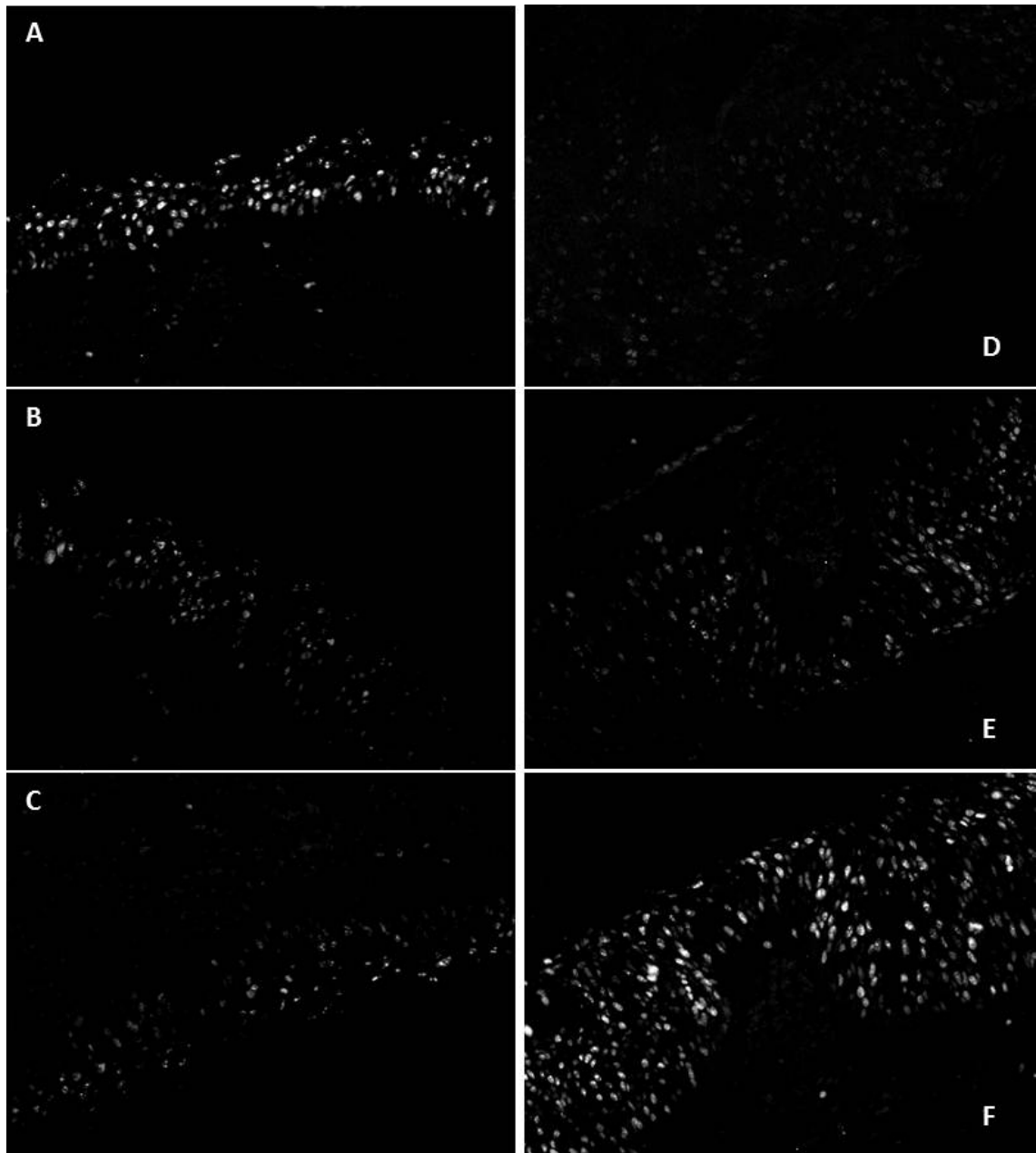
Para a otimização do uso dos anticorpos primários, foram testadas em amostras de todos os grupos de lesão, as diluições de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1000 e 1:2000. Após a determinação da melhor concentração a ser utilizada para cada anticorpo, foram testados os períodos de incubação de 1 hora, 3 horas e 18 horas. Os resultados apresentados nas figuras 11 e 13, referem-se àqueles obtidos pela análise de uma amostra de NIC III.

Considerando a padronização do anticorpo anti- p16<sup>INK4a</sup>, pôde ser observado um aumento na intensidade da marcação pelo uso do anticorpo diluído na razão de 1:800 e incubado por cerca de 18 horas a 4°C (Fig. 11).



**FIGURA 11: Curva de diluição e do tempo de incubação do anticorpo anti-p16<sup>INK4a</sup> em amostras cervicais de NIC III, utilizando-se a técnica de Imunofluorescência Indireta. Observa-se maior intensidade de marcação nas secções correspondentes à diluição de 1:800 e ao tempo de incubação de 18 horas do anticorpo anti-p16<sup>INK4a</sup> a 4°C (A- 1:200; B- 1:800; C- 1:1000; D- 1 hora; E- 3 horas; F- 18 horas). Aumento: 200X.**

Em relação à padronização do anticorpo direcionado ao antígeno de proliferação Ki-67, verificou-se um aumento na intensidade da marcação pelo uso do anticorpo diluído na razão de 1:100 e incubado por cerca de 18 horas a 4°C (Fig. 12).



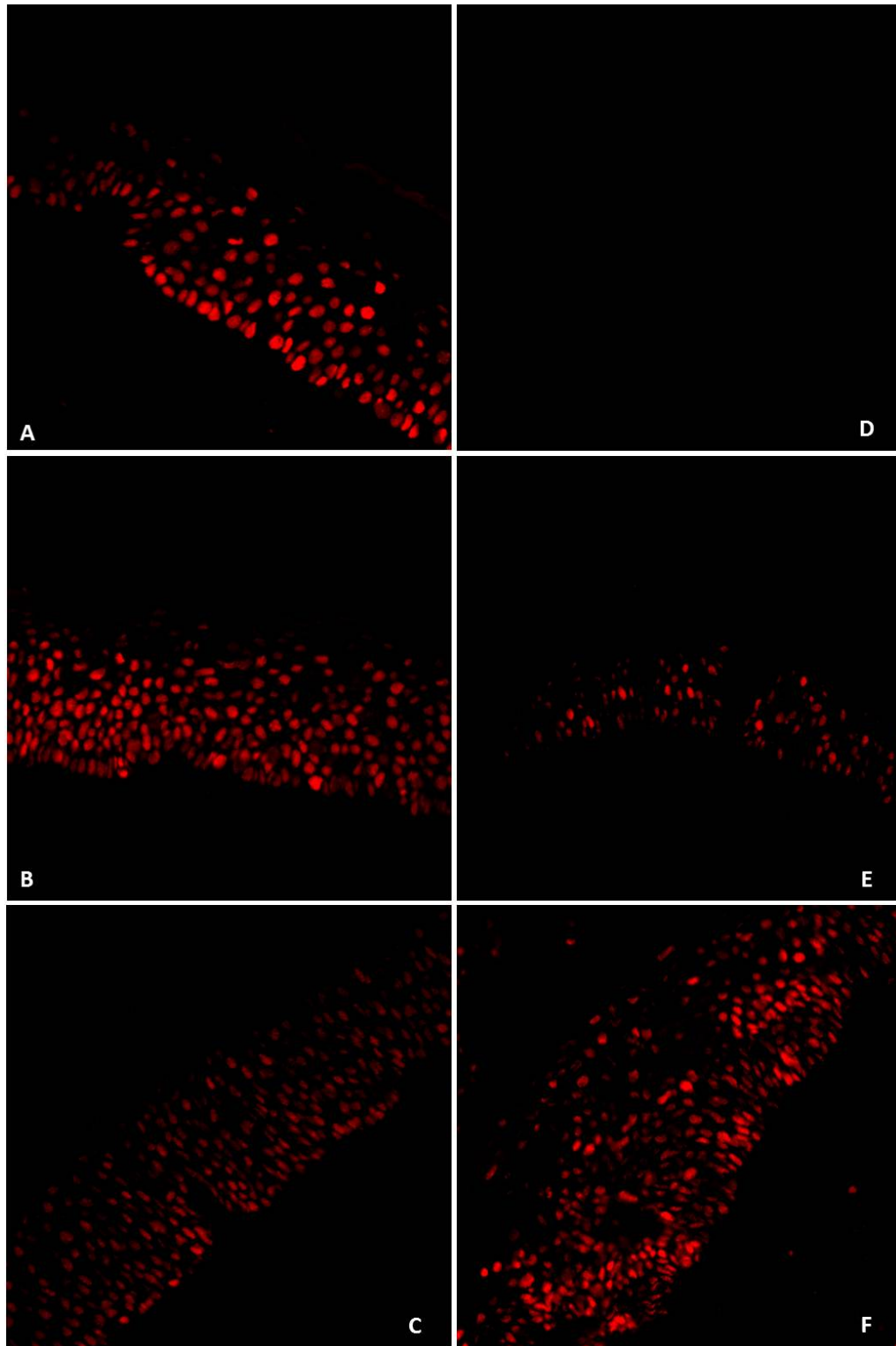
**FIGURA 12:** Curva de diluição e do tempo de incubação do anticorpo anti-Ki67 em amostras cervicais de NIC III, utilizando-se a técnica de Imunofluorescência Indireta. Observa-se maior intensidade de marcação nas secções correspondentes à diluição de 1:100, e ao tempo de incubação de 18 horas do anticorpo anti-Ki67 a 4°C (A- 1:100; B- 1:400; C- 1:800; D- 1 hora; E- 3 horas; F- 18 horas). Aumento: 400X.

Pela realização dos experimentos de padronização do anticorpo anti-MCM7, observou-se um aumento na intensidade da marcação do anticorpo diluído na razão de 1:1000 e incubado por cerca de 18 horas a 4°C (Fig. 13).

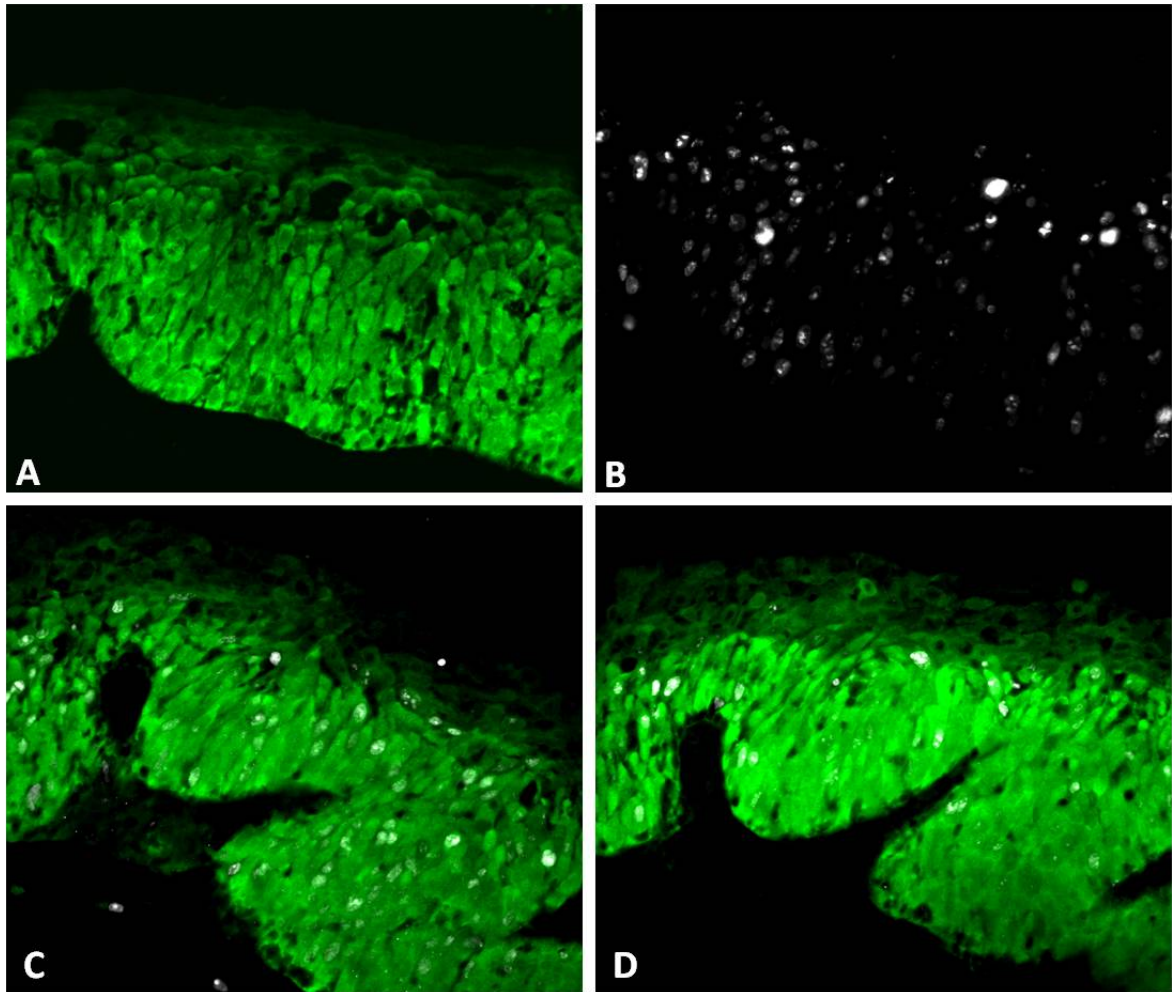
Em relação ao uso dos anticorpos secundários, a utilização desses anticorpos diluídos a 1:200 durante o período de incubação de 1 hora à temperatura ambiente, mostrou os melhores resultados para a revelação dos anticorpos primários.

Para verificar-se uma possível reação inespecífica desenvolvida pelos anticorpos secundários, realizou-se um experimento no qual os anticorpos primários foram substituídos pela solução de bloqueio (PBS/BSA 2%), onde nenhuma marcação inespecífica foi observada. Adotou-se esse procedimento como o controle negativo da reação, de forma que em cada experimento realizado, uma lâmina de Carcinoma Invasor foi introduzida como controle negativo da reação, na qual o anticorpo primário foi substituído como descrito acima.

Considerando o grande número de amostras que seria analisado no presente estudo, e a possibilidade de realização da co-localização de dois marcadores (p16<sup>INK4a</sup> e Ki-67) em uma única etapa de reação, constituiu-se um de nossos objetivos, verificar a presença de uma possível reação cruzada entre os anticorpos primários anti-p16 e anti-Ki67, uma vez que os mesmos seriam utilizados em conjunto e diluídos em uma única solução. Para tal, foram realizados três tipos de experimentos, utilizando-se amostras provenientes de todos os grupos de lesões, embora sejam apresentados os resultados referentes apenas à uma amostra de NIC III (Fig. 14). O primeiro experimento foi realizado, utilizando-se os dois anticorpos primários em cortes histológicos separados (Fig. 14, A e B). O segundo foi realizado, adicionando-se os dois anticorpos primários sobre o mesmo corte: no entanto, os anticorpos foram diluídos em soluções separadas e incubados separadamente, com uma etapa de bloqueio entre a incubação de cada anticorpo (Fig. 14C). No terceiro experimento, os anticorpos primários também foram adicionados conjuntamente sobre uma mesma lâmina, porém os anticorpos foram diluídos e incubados em uma única solução (Fig. 14D). Todos os três experimentos descritos apresentaram praticamente o mesmo resultado, em termos da intensidade da marcação obtida, sendo mais viável a escolha do protocolo estabelecido no terceiro experimento, uma vez que o tempo gasto na sua execução para análise de cada amostra, seria consideravelmente menor.



**FIGURA 13:** Curva de diluição e do tempo de incubação do anticorpo anti-MCM7 em amostras cervicais de NIC III, utilizando-se a técnica de Imunofluorescência Indireta. Observa-se maior intensidade de marcação nas secções correspondentes à diluição de 1:1000, e ao tempo de incubação de 18 horas do anticorpo anti-MCM7 a 4°C (A- 1:800; B- 1:1000; C- 1:2000; D- 1 hora; E- 3 horas; F- 18 horas). Aumento: 400X.



**FIGURA 14: Verificação de possível reação cruzada entre os anticorpos primários (anti-p16<sup>INK4a</sup> e anti-Ki67) pela técnica de Imunofluorescência Indireta em amostras cervicais de NIC III. A-B: marcação dos anticorpos primários (A: p16<sup>INK4a</sup>, B: Ki-67) em cortes histológicos separados; C: marcação dos anticorpos primários adicionados sobre um único corte, onde os anticorpos foram diluídos em soluções separadas e incubados separadamente com uma etapa de bloqueio entre a incubação de cada anticorpo (p16<sup>INK4a</sup> - verde; Ki-67 - branco); D: marcação dos anticorpos primários sobre um único corte, onde os anticorpos foram diluídos e incubados em uma única solução (p16<sup>INK4a</sup> - verde; Ki-67 - branco). Aumento: 400X.**

Considerando que a maioria dos trabalhos descritos na literatura, utiliza a técnica de Imunohistoquímica (baseada no uso da peroxidase) para análise dos marcadores citados acima, no presente estudo foi avaliada a viabilidade do uso da técnica de Imunofluorescência Indireta, em comparação à técnica de Imunohistoquímica, para análise das amostras cervicais.



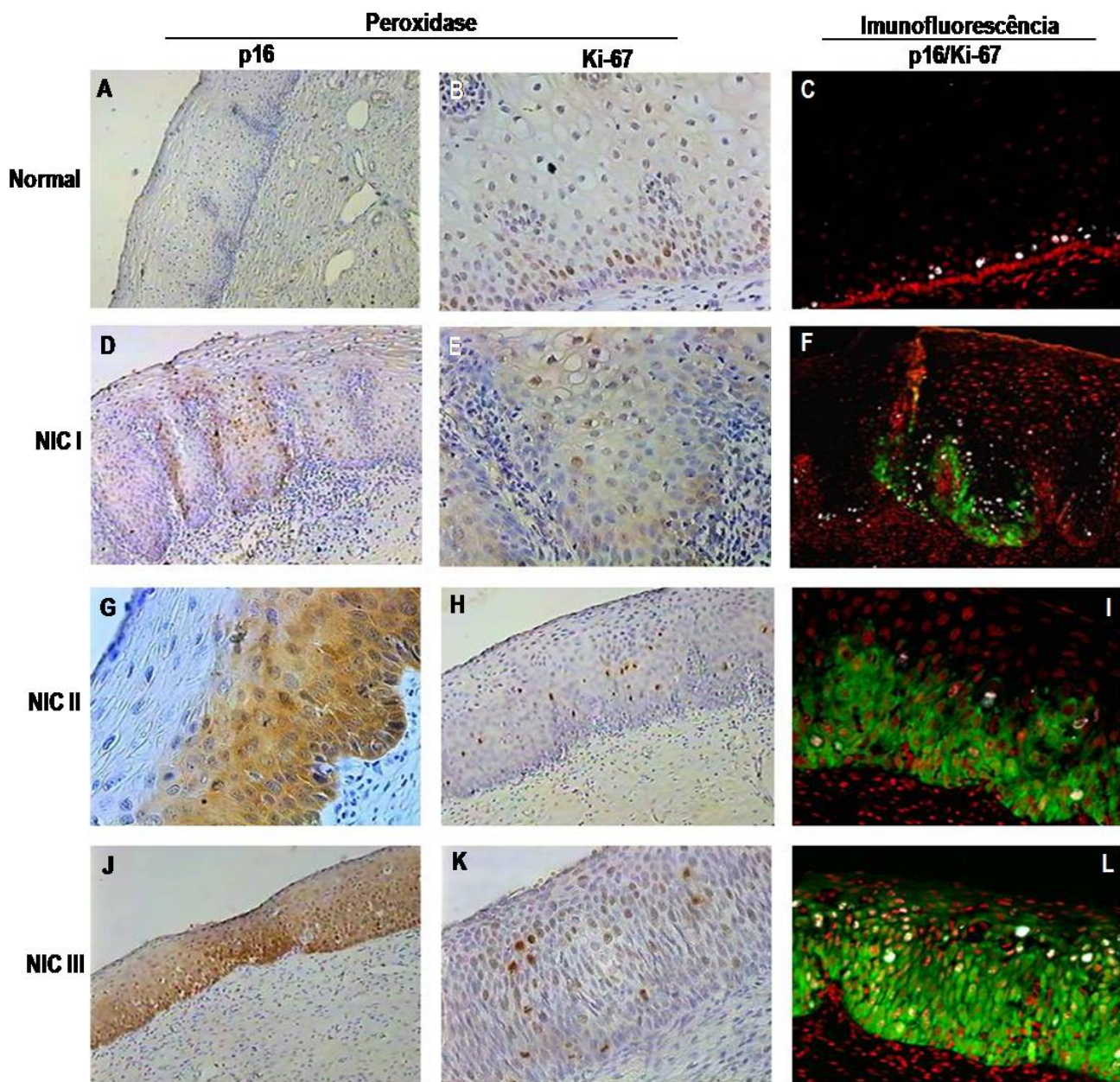
Assim, após padronização da técnica de Imunofluorescência, foi de nosso interesse realizar uma comparação entre a expressão das proteínas p16<sup>INK4a</sup> e Ki-67 pelas técnicas de Imunofluorescência Indireta e Imunohistoquímica.

O experimento de comparação entre as duas técnicas foi realizado com 15 amostras cervicais sendo 3 de cada grupo de neoplasia (NIC I, II e III) e 3 amostras de tecido sem neoplasia cervical (Fig. 15). Os resultados obtidos pela análise dessas amostras, foram semelhantes entre as técnicas de Imunofluorescência e Imunohistoquímica. No entanto, uma maior concentração do anticorpo primário anti-Ki67 (1:50) foi necessária para realização da técnica de Imunohistoquímica, uma vez que nenhuma marcação foi obtida quando utilizou-se a diluição desse anticorpo padronizada para a técnica de Imunofluorescência Indireta (1:100), apresentando a última técnica, maior sensibilidade.

Em relação à marcação de p16<sup>INK4a</sup>, observou-se nas amostras de NIC I (D e F) marcação de 1/3 basal do epitélio, nas amostras de NIC II (G e I) marcação dos 2/3 basais e nas amostras de NIC III (J e L), marcação de toda a espessura do epitélio lesado.

Quanto à marcação de Ki-67 verificou-se um padrão de expressão similar à proteína p16<sup>INK4a</sup>, com marcação de 1/3 basal do epitélio nas amostras de NIC I (E e F), marcação dos 2/3 basais nas amostras de NIC II (H e I) e marcação de toda a espessura do epitélio nas amostras de NIC III (K e L).

Após a realização desse estudo comparativo, alcançamos a validação do uso da técnica de Imunofluorescência Indireta para a análise das amostras do presente estudo. Da mesma forma verificou-se uma vantagem na utilização dessa técnica em relação à técnica de Imunohistoquímica, uma vez que o tempo necessário à realização dos experimentos foi bastante reduzido, além da possibilidade da realização de dupla marcação com dois distintos anticorpos em uma mesma lâmina e assim verificar a co-localização de dois diferentes marcadores.



**FIGURA 15:** Expressão dos anticorpos anti-p16<sup>INK4a</sup> e anti-Ki67, em amostras de tecidos cervicais, pela utilização das técnicas de Imunohistoquímica (marcação pela Peroxidase) e Imunofluorescência Indireta. A, D, G, J: Expressão de p16<sup>INK4a</sup> pela técnica de Imunohistoquímica; B, E, H, K: Expressão de Ki-67 pela técnica de Imunohistoquímica; C, F, I, L: Expressão de p16<sup>INK4a</sup> (verde) e Ki-67 (branco) pela técnica de Imunofluorescência Indireta. A-C: Controle negativo; D-F: NIC I; G-I: NIC II; J-L: NIC III. Núcleos corados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Aumentos: B, C, E, G, I, K, L: 400X; F: 200X; A, D, H, J: 100X.

## **5.2 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO CICLO CELULAR (P16<sup>INK4a</sup>, KI-67 E MCM7) NAS LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS**

### *5.2.1 Correlação entre a expressão dos biomarcadores p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7 e o grau da neoplasia cervical.*

Um total de 80 amostras cervicais (24 amostras de mucosa cervical normal sem alteração histopatológica, 17 amostras de NIC I, 18 de NIC II, 21 de NIC III) foi analisado quanto à imunorreatividade dos marcadores p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7.

Como mencionado na seção de Metodologia, um ajuste prévio dos valores da expressão de cada biomarcador obtidos pela análise de amostras cervicais individuais, foi realizado em etapa anterior ao cálculo da expressão média de cada marcador, verificada por grupo de lesão. Assim, esses valores médios de expressão, foram ajustados para a menor área de epitélio lesado verificado entre as 56 amostras de NIC analisadas, correspondente a 33.091,6  $\mu\text{m}^2$ .

A Tabela 2 apresenta a média dos valores obtidos para a área de expressão de p16<sup>INK4a</sup> e para a distribuição de células e/ou núcleos positivos para os marcadores p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7.

Em relação aos resultados obtidos para p16<sup>INK4a</sup>, as mucosas normais não apresentaram nenhuma área positiva ou células imunorreativas para a proteína. Entretanto, observou-se um aumento da área marcada por p16<sup>INK4a</sup> de acordo com o grau de severidade da lesão cervical (Tabela 2). Um resultado similar foi verificado, quando esses valores foram expressos em escala semi-quantitativa: a maioria das amostras de NIC I, II e III exibiu um padrão crescente de áreas marcadas por p16<sup>INK4a</sup> (Tabela 3). Assim, como verificado na análise quantitativa da área de marcação por p16<sup>INK4a</sup>, observou-se um aumento de células positivas para p16<sup>INK4a</sup> de acordo com o grau da neoplasia cervical (Tabela 2). O mesmo aumento pôde ser observado, quando esses resultados foram expressos semi-quantitativamente (Tabela 3).

Considerando os resultados obtidos para Ki-67, o número de núcleos positivos para este marcador, aumentou do epitélio normal para NIC III (Tabela 2). Diferente do que foi observado nos resultados relativo à expressão da proteína p16<sup>INK4a</sup>, cuja marcação foi completamente negativa no epitélio normal, verificou-se uma marcação para Ki-67 nas

camadas basais do epitélio em todas as amostras de tecido cervical normal. Quando realizada uma comparação entre os resultados referentes à expressão de Ki-67 nos diferentes grupos, porém expressos em escala semi-quantitativa, observou-se que a maioria das amostras de tecido normal, NIC I e NIC II, mostrou um padrão similar de marcação para Ki-67 (gradação +2), enquanto que as amostras de NIC III exibiram uma forte variação entre a distribuição da marcação (Tabela 3).

Por meio da análise da expressão da proteína MCM7 nas amostras de mucosa cervical normal, assim como observado para Ki-67, evidenciou-se uma marcação no terço basal do epitélio. Uma crescente expressão de MCM7 foi observada a partir do tecido normal até as amostras de NIC III, com um valor de expressão da proteína mais elevado, detectado no grupo das amostras de NIC III (Tabela 2). Além disso, observou-se uma diferença na graduação das amostras de lesão de baixo grau e de alto grau: a maioria das amostras de tecido normal e de NIC I foram graduadas como +2, enquanto que a maioria das amostras de NIC II e NIC III (61% e 76%, respectivamente), foram graduadas como +4 (Tabela 3).

Considerando-se o índice de marcação (LI – *labeling index*) obtido pelo emprego dos biomarcadores no epitélio cervical, foram observados os seguintes valores médios de LI para p16<sup>INK4a</sup>, entre os diferentes grupos de lesão: 0 para o epitélio normal, de 34,6 (0-88,7) para NIC I, de 68,8 (0-97,7) para NIC II e de 90,6 (62,5-100) para as amostras de NIC III [P<0.05]. Em relação aos valores médios de LI obtidos para Ki-67 nos grupos correspondentes, esses valores foram de 25,4 (15,8-39,9), 34,6 (8,4-76,2), 36,8 (14,4-66,2) e 49,4 (19,3-84,7) [P<0.05]. Os valores médios de LI obtidos para MCM7 foram de 28,1 (15,1-45,7) para as amostras cervicais normais, de 41,5 (20,2-88,8) para NIC I, de 63,7 (37,7-89,5) para NIC II e de 75,1 (27,8-100) para NIC III [P<0.05] (Tabela 4).

**TABELA 2: Valores médios da expressão de p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7 obtidos de acordo com o diagnóstico histopatológico\*.**

|         | <b>p16<sup>INK4a</sup> (§)</b><br><b>Área</b> | <b>p16<sup>INK4a</sup> (§)</b><br><b>Células positivas</b> | <b>Ki-67 (§)</b><br><b>Núcleos positivos</b> | <b>MCM7 (§)</b><br><b>Núcleos positivos</b> |
|---------|---|--|--|---|
| Normal  | 0   | 0  | 28,5<br>(12,9-59,4)                          | 30,9<br>(17,1-43,2)                         |
| NIC I   | 5701,5<br>(0-22620,1)                         | 56,4<br>(0-142)  | 61,2<br>(18,4-138,9)                         | 99,2<br>(36,7-362,4)                        |
| NIC II  | 15452,4<br>(0-26530,9)                        | 137,5<br>(0-209,3)   | 69,2<br>(19-154,1)                           | 142,6<br>(44,2-495,8)                       |
| NIC III | 24003,1<br>(13302,7-31893,6)                  | 181,6<br>(78,1-262,1)                                      | 95,9<br>(37,8-192)                           | 158,5<br>(19,5-569,8)                       |

\*Análise quantitativa para a expressão dos biomarcadores p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7. O menor e o maior valor médio, obtidos para cada marcador considerado dentro de cada grupo de lesão, são mostrados entre parênteses. § P<0.05. Teste de Coeficiente de Correlação de Spearman.

**TABELA 3: Expressão de p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7 obtidos de acordo com o diagnóstico histopatológico\*.**

| Graduação   | <b>Área de marcação p16<sup>INK4a</sup> (§)</b> |       |        |         | <b>Nº de células marcadas p16<sup>INK4a</sup> (§)</b> |       |        |         |
|-------------|---|-------|--------|---------|---|-------|--------|---------|
|             | Normal  | NIC I | NIC II | NIC III | Normal  | NIC I | NIC II | NIC III |
|             | %   | %     | %      | %       | %   | %     | %      | %       |
| 0           | 100   | 29,4  | 11,1   | 0       | 100   | 29,4  | 11,1   | 0       |
| +1 (5-25%)  | 0   | 47,1  | 5,6    | 0       | 0   | 17,6  | 0      | 0       |
| +2 (25-75%) | 0   | 23,5  | 77,8   | 47,6    | 0   | 47,1  | 22,2   | 9,5     |
| +3 (> 75%)  | 0   | 0     | 5,5    | 52,4    | 0   | 5,9   | 66,7   | 90,5    |
| Graduação   | <b>Nº de núcleos marcados Ki 67 (§)</b>         |       |        |         | <b>Nº de núcleos marcados MCM7 (§)</b>                |       |        |         |
|             | Normal  | NIC I | NIC II | NIC III | Normal  | NIC I | NIC II | NIC III |
|             | %   | %     | %      | %       | %   | %     | %      | %       |
| 0           | 0   | 0     | 0      | 0       | 0   | 0     | 0      | 0       |
| +1 (1-20%)  | 20,8  | 17,6  | 11,1   | 4,8     | 12,5  | 0     | 0      | 0       |
| +2 (20-40%) | 79,2  | 58,8  | 55,5   | 33,3    | 83,3  | 47    | 5,6    | 9,5     |
| +3 (40-60%) | 0   | 11,8  | 16,7   | 28,6    | 4,2   | 41,2  | 33,3   | 14,3    |
| +4 (>60%)   | 0   | 11,8  | 16,7   | 33,3    | 0   | 11,8  | 61,1   | 76,2    |

\*Análise semi-quantitativa para a expressão dos três biomarcadores. Graduação baseada na porcentagem de área e de células expressando os biomarcadores p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7, em diferentes grupos de lesão. § P<0.05. Teste de Coeficiente de Correlação de Spearman.

**TABELA 4: Valores médios dos índices de marcação (LI - labeling index) dos Biomarcadores p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7\*.**

|         | p16 <sup>INK4a</sup> (§) | Marcadores de Proliferação |                  |
|---------|--------------------------|----------------------------|------------------|
|         |                          | Ki-67 (§)                  | MCM7 (§)         |
| Normal  | 0                        | 25,4 (15,8-39,9)           | 28,1 (15,1-45,7) |
| NIC I   | 34,6 (0-88,7)            | 34,6 (8,4-76,2)            | 41,5 (20,2-88,8) |
| NIC II  | 68,8 (0-97,7)            | 36,8 (14,4-66,2)           | 63,7 (37,7-89,5) |
| NIC III | 90,6 (62,5-100)          | 49,4 (19,3-84,7)           | 75,1 (27,8-100)  |

\*Análise quantitativa para a expressão dos biomarcadores p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7. O menor e o maior valor médio, obtidos para cada marcador considerado dentro de cada grupo de lesão, são mostrados entre parênteses. § P<0.05. Teste de Coeficiente de Correlação de Spearman.

**TABELA 5: Topografia da expressão de p16, Ki-67 e MCM7 obtidos de acordo com o diagnóstico histopatológico\*.**

|         | p16 <sup>INK4a</sup> (§) |      |      |      | Ki-67 (§) |      |      | MCM7 (§) |      |      |
|---------|--------------------------|------|------|------|-----------|------|------|----------|------|------|
|         | 0                        | 1/3  | 2/3  | 3/3  | 1/3       | 2/3  | 3/3  | 1/3      | 2/3  | 3/3  |
|         | %                        | %    | %    | %    | %         | %    | %    | %        | %    | %    |
| Normal  | 100                      | 0    | 0    | 0    | 100       | 0    | 0    | 100      | 0    | 0    |
| NIC I   | 29,4                     | 29,4 | 35,3 | 5,9  | 41,2      | 52,9 | 5,9  | 58,8     | 35,3 | 5,9  |
| NIC II  | 11,1                     | 0    | 55,6 | 33,3 | 11,1      | 72,2 | 16,7 | 0        | 83,3 | 16,7 |
| NIC III | 0                        | 0    | 9,5  | 90,5 | 0         | 33,3 | 68,7 | 4,8      | 33,3 | 61,9 |

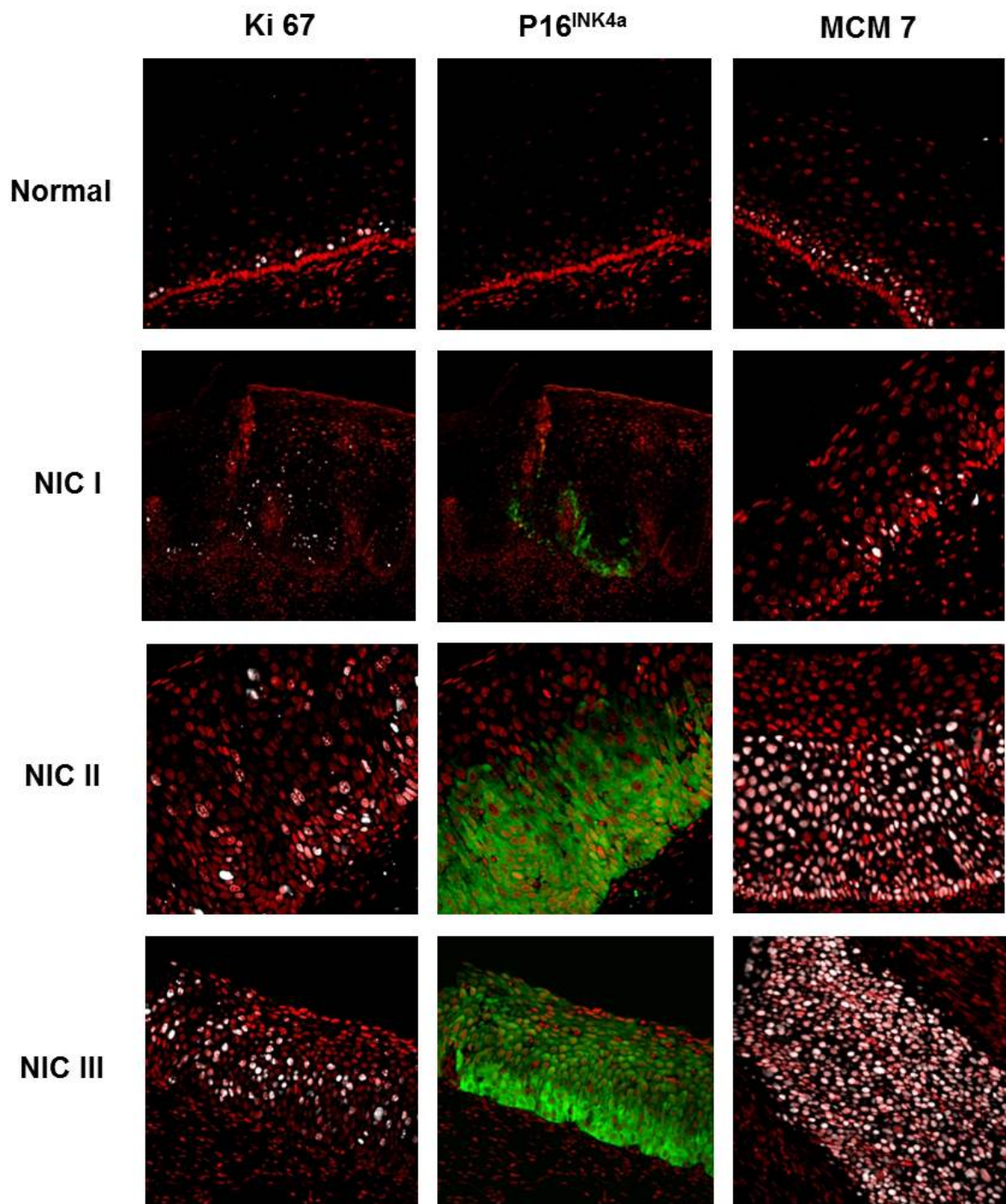
\*Porcentagem de amostras em cada grupo histopatológico exibindo a topografia da expressão dos biomarcadores p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7 em 1/3 basal, 2/3 basais e na espessura total do epitélio cervical. § P<0.05. Teste de Coeficiente de Correlação de Spearman.

Em relação à topografia da expressão dos três biomarcadores no epitélio cervical, observou-se que todas as amostras de tecido normal foram negativas para p16<sup>INK4a</sup>, e exibiram marcação no terço basal para Ki-67 e MCM7 (Figura 16). Quanto à marcação de p16<sup>INK4a</sup> nas

amostras de neoplasia cervical, a maioria dos casos de NIC I e NIC II exibiu marcação para p16<sup>INK4a</sup> nos 2/3 basais, enquanto que 90% das amostras de NIC III, mostraram imunorreatividade nos 3/3 do epitélio lesado

. Considerando a topografia da expressão de Ki-67, 53% das amostras de NIC I e 72% das amostras de NIC II mostraram 2/3 do epitélio marcados, enquanto que 69% das amostras de NIC III exibiram marcação em toda a espessura do epitélio. Em relação à topografia da expressão de MCM7, a maioria das amostras de NIC I apresentou expressão de MCM7 no terço basal do epitélio, enquanto que a maioria dos casos de NIC II e III exibiu marcação nos 2/3 e 3/3 do epitélio, respectivamente.





**FIGURA 16:** Expressão dos biomarcadores p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7 em amostras de tecidos cervicais, pela utilização da técnica de Imunofluorescência Indireta. Células positivas para Ki-67 e MCM7 apresentam marcação nuclear (branco), enquanto que as células positivas para p16<sup>INK4a</sup> apresentam marcação nuclear e/ou citoplasmática (verde). Os núcleos estão marcados com iodeto de propídeo (vermelho).



### 5.2.2 Correlação entre a expressão dos biomarcadores p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7.

No presente estudo realizou-se uma comparação entre a expressão da proteína MCM7 e a expressão das proteínas p16<sup>INK4a</sup> e Ki-67, na qual utilizou-se o Coeficiente de Correlação de Pearson para a avaliação entre a distribuição das células e/ou núcleos positivos, e o Coeficiente de Correlação de Spearman para a comparação entre a topografia da expressão dos biomarcadores.

Considerando-se o padrão de distribuição das células e/ou núcleos positivos e a topografia da expressão dos três biomarcadores, nas amostras de mucosa cervical normal sem alteração histopatológica e nas amostras cervicais com lesão intraepitelial, observou-se uma correlação positiva entre a expressão da proteína MCM7 e a expressão das proteínas p16<sup>INK4a</sup> e Ki-67. A tabela 6 exibe os resultados obtidos pela análise comparativa da expressão dos biomarcadores p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7, nas amostras cervicais estudadas.

**TABELA 6: Correlação da expressão da proteína MCM7 e das proteínas p16<sup>INK4a</sup> e Ki-67 em amostras cervicais.**

|                                 | <b>Padrão</b> | <b>Coeficiente de Correlação (r)</b> | <b>Valor de P</b> |
|---------------------------------|---------------|--------------------------------------|-------------------|
| <b>MCM7/P16<sup>INK4a</sup></b> | Distribuição* | 0.5366                               | P < 0.0001        |
|                                 | Topografia    | 0.8024                               | P < 0.0001        |
| <b>MCM7/Ki-67</b>               | Distribuição* | 0.3821                               | P < 0.0005        |
|                                 | Topografia    | 0.8175                               | P < 0.0001        |

\*Considera-se a distribuição das células e/ou núcleos positivos para expressão dos biomarcadores relacionados acima.

## 5.3 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO E POR TIPOS DE HPV DE ALTO RISCO EM LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS

### 5.3.1 Análise da integridade do DNA extraído das amostras cervicais estudadas

Para avaliar a integridade do DNA obtido das amostras cervicais após extração, foi utilizada a amplificação do fragmento de 110 pb do gene de  $\beta$  – globina humana.

A Figura 17 ilustra os produtos obtidos pela PCR do fragmento de 110 pb do gene de  $\beta$  - globina humano. Observa-se a presença de um fragmento de aproximadamente 110 pb nas canaletas correspondentes às amostras que apresentaram amplificação positiva do gene de  $\beta$  - globina humano.

Todas as amostras de DNA extraídas das 80 amostras cervicais estudadas incluindo 24 amostras de mucosa cervical normal sem alteração histopatológica, 17 amostras de NIC I, 18 de NIC II e 21 de NIC III foram analisadas quanto à sua integridade. Verificou-se que todas as amostras analisadas apresentaram amplificação positiva para o gene de  $\beta$  - globina (Tabela 7).

**TABELA 7: Análise da integridade do DNA genômico e da infecção e tipagem pelo Papilomavírus Humano (HPV) nas amostras cervicais.**

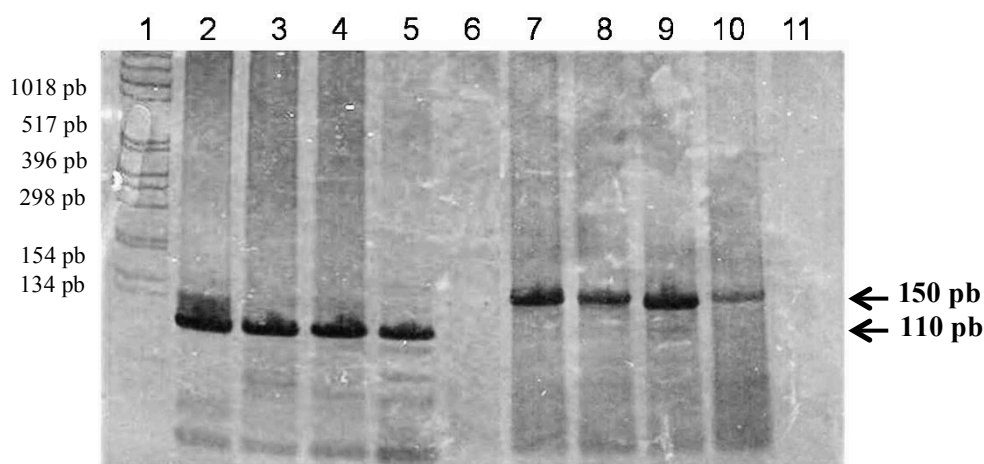
|         | <b><math>\beta</math>-Globina</b> |       | <b>GP5/GP6+</b> |           | <b>HPV 16</b> |           | <b>HPV 18</b> |           |
|---------|-----------------------------------|-------|-----------------|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|
|         | n (%)                             | n (%) | n (%)           | n (%)     | n (%)         | n (%)     | n (%)         | n (%)     |
|         | +                                 | -     | +               | -         | +             | -         | +             | -         |
| Normal  | 24 (100)                          | 0     | 0               | 24 (100)  | 0             | 24 (100)  | 0             | 24 (100)  |
| NIC I   | 17 (100)                          | 0     | 10 (58,8)       | 7 (41,2)  | 5 (29,4)      | 12 (70,6) | 2 (11,8)      | 15 (88,2) |
| NIC II  | 18 (100)                          | 0     | 12 (66,7)       | 6 (33,3)  | 9 (50)        | 9 (50)    | 1 (5,6)       | 17 (94,4) |
| NIC III | 21 (100)                          | 0     | 11 (52,4)       | 10 (47,6) | 7 (33,3)      | 14 (66,7) | 4 (19)        | 17 (81)   |

NIC - Neoplasia Intraepitelial Cervical; + amostras positivas; - amostras negativas.

### 5.3.2 Detecção do DNA do HPV nas amostras cervicais estudadas

A Figura 17 apresenta os produtos de amplificação obtidos pela utilização dos iniciadores GP5 / GP6+. Verifica-se a presença de um fragmento de aproximadamente 150 pb nas canaletas correspondentes às amostras que apresentaram amplificação positiva com os iniciadores GP5 / GP6+.

Em relação à amplificação do fragmento viral de 150 pb do gene *L1*, nas amostras de mucosa cervical normal sem alteração histopatológica, não houve positividade para o DNA do HPV. Porém, no grupo das amostras classificadas como NIC I, quase 59% das amostras foram positivas para a amplificação do gene viral. No grupo de NIC II, 12 (67%) amostras apresentaram o DNA do HPV, enquanto que 6 amostras (33%) foram negativas para o DNA do vírus. Considerando as amostras de NIC III, 11 (52%) amostras foram positivas para o HPV, enquanto que 10 (48%) amostras foram negativas para o DNA viral (Tabela 7).



**FIGURA 17: Amplificação do fragmento de 110 pb do gene de  $\beta$ -globina humano e do fragmento viral de 150 pb.** Canaleta 1: padrão de Peso Molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen); canaleta 2: controle positivo da reação (amostra de DNA extraída de sangue); canaletas 3 a 5: produtos da PCR obtidos das amostras positivas para o gene de  $\beta$ -globina humano; canaleta 6: controle negativo da reação (componentes da PCR sem DNA adicionado); canaleta 7: controle positivo da reação (DNA extraído de células HeLa); canaletas 8 a 10: produtos da PCR obtidos das amostras que apresentaram amplificação positiva com os iniciadores GP5 / GP6+; canaleta 11: controle negativo da reação (componentes da PCR sem DNA adicionado).

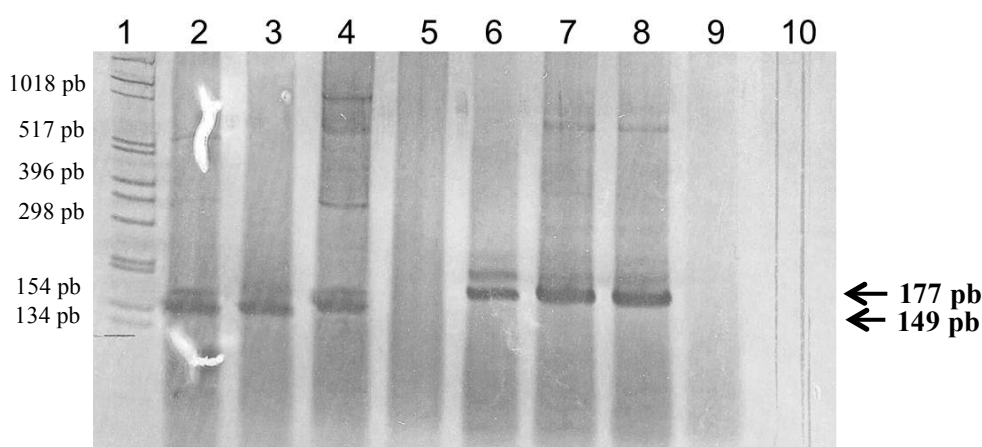
### 5.3.3 Tipagem dos HPVs nas amostras cervicais estudadas

No presente estudo realizou-se nas amostras cervicais analisadas a pesquisa do DNA dos HPVs de alto risco, 16 e 18. A figura 18 apresenta os produtos de PCR obtidos pela amplificação de fragmentos dos genes *E6* e *E7* dos HPVs 16 e 18. Verifica-se a presença de um fragmento de aproximadamente 149 pb nas canaletas correspondentes às amostras que apresentaram amplificação positiva para o HPV 16, assim como um fragmento de aproximadamente 177 pb nas canaletas correspondentes às amostras que apresentaram amplificação positiva para o HPV18.

Em relação à prevalência do HPV 16 no grupo das amostras classificadas como mucosa cervical normal, não houve amplificação do fragmento viral dentro desse grupo. Nas amostras de NIC I, apenas 29% mostraram amplificação do fragmento genômico do HPV 16, enquanto que 71% das amostras foram negativas para esse tipo.

Considerando as amostras de NIC II, houve um aumento na prevalência deste tipo viral, sendo que 50% dos casos apresentaram amplificação positiva. Em relação às amostras de NIC III, 33% dos casos foram considerados positivos para o HPV 16 (Tabela 7).

Quanto à prevalência do HPV 18, assim como observado na tipagem do HPV 16, as amostras cervicais de mucosa normal não foram positivas para esse tipo viral. Em relação às amostras de NIC I e NIC II, 12% e 6% dos casos foram positivos para o HPV 18, respectivamente, enquanto que 19% das amostras de NIC III apresentaram amplificação positiva para este tipo viral (Tabela 7).



**FIGURA 18: Amplificação do fragmento de 149 pb do HPV 16 e do fragmento de 177 pb do HPV 18.** Canaleta 1: padrão de Peso Molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen); canaletas 2 a 4: produtos da PCR obtidos das amostras positivas para o HPV 16; canaleta 5: produto da PCR obtido da amostra negativa para o HPV 16 canaletas 6 a 8: produtos da PCR obtidos das amostras positivas para o HPV 18; canaleta 9: produto da PCR obtido da amostra negativa para o HPV 18; canaleta 10: controle negativo da reação (componentes da PCR sem DNA adicionado).

#### **5.4 CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS BIOMARCADORES P16<sup>INK4a</sup>, KI-67 E MCM7 E A INFECÇÃO PELO HPV EM LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS**

Quando realizada a associação entre a presença do DNA do HPV e o nível de expressão de p16<sup>INK4a</sup> observou-se, no presente estudo, uma correlação significativa ( $P < 0.05$  – Coeficiente de Correlação de Spearman) entre a infecção pelo HPV e a superexpressão da proteína p16<sup>INK4a</sup>, onde 54% das amostras positivas para p16<sup>INK4a</sup>, também foram positivas

para o DNA de HPV. Porém, 33% dos casos positivos para a expressão de p16<sup>INK4a</sup>, não apresentaram amplificação do DNA viral, e 7% das amostras positivas para o HPV, não apresentaram expressão da proteína p16<sup>INK4a</sup>. Apenas três amostras (5%) foram negativas para p16<sup>INK4a</sup> e para a presença do DNA viral (Tabela 8).

**TABELA 8: Associação entre a expressão de p16<sup>INK4a</sup> e a presença do DNA do HPV. (\*)**

|                      |     | Classificação Histopatológica |           |           |           |
|----------------------|-----|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| p16 <sup>INK4a</sup> | HPV | NIC I                         | NIC II    | NIC III   | Total     |
|                      |     | n (%)                         | n (%)     | n (%)     | n (%)     |
| +                    | +   | 6 (35,3)                      | 12 (66,7) | 12 (57,1) | 30 (53,6) |
| +                    | -   | 6 (35,3)                      | 4 (22,2)  | 9 (42,9)  | 19 (33,9) |
| -                    | +   | 4 (23,5)                      | 0         | 0         | 4 (7,1)   |
| -                    | -   | 1 (5,9)                       | 2 (11,1)  | 0         | 3 (5,4)   |
| Total                |     | 17                            | 18        | 21        | 56        |

\*O valor de p16<sup>INK4a</sup> foi considerado positivo quando a expressão da proteína foi igual ou superior a 1+ (5-25%). Foram consideradas como HPV positivo (+), as amostras que apresentaram a amplificação de qualquer fragmento do genoma viral (fragmento de 110 pb do gene *L1* ou amplificação positiva do HPV 16 e/ou 18).

No presente trabalho, ao analisar-se a correlação entre a presença do DNA do HPV e a expressão de Ki-67, não pôde ser observada uma correlação significativa entre a expressão da proteína e a infecção pelo HPV ( $P > 0.05$  – Coeficiente de Correlação de Spearman). No entanto, quando investigada a presença de associação entre a imunorreatividade de MCM7 e a infecção pelo HPV, verificou-se uma correlação positiva entre a expressão desse biomarcador e a presença do DNA viral ( $P < 0.05$  – Coeficiente de Correlação de Spearman).

Ao longo das três últimas décadas, diversos estudos epidemiológicos e clínico-laboratoriais demonstraram que o carcinoma escamoso da cérvix uterina é uma doença complexa e resultante de múltiplos determinantes sócio-ambientais, genéticos, biológicos e moleculares. A presença da infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV) de alto risco e o comprometimento da resposta imune celular são fatores que estão diretamente envolvidos na patogênese do câncer cervical (zur HAUSEN, 2002; SCOTT *et al.*, 2001; PATEL & CHIPLUNKAR, 2009).

A principal estratégia utilizada na prevenção e no controle da doença é a sua detecção precoce, permitindo que intervenções e terapias efetivas possam contribuir para a redução da mortalidade e morbidade por esse tipo de neoplasia. O exame de citologia oncótica (Papanicolau) ainda constitui o principal método utilizado para a detecção do câncer do colo uterino e de suas lesões precursoras. Programas de triagem baseados nesta metodologia levaram, nas últimas décadas, a uma diminuição significativa da incidência por este tipo de câncer. Contudo, as técnicas de diagnóstico citopatológico e histopatológico apresentam limitações na detecção de atipias leves (ASCUS e AGUS), de lesões de baixo grau e adenocarcinomas, que podem ser atribuídas à má interpretação de células cervicais anormais ou de células inflamatórias e hiperplásicas, assim como à ocorrência de variação inter-observador (ARORA *et al.*, 2005; CLIFFORD *et al.*, 2006). Assim, com base nessas considerações, torna-se necessário o desenvolvimento de novos biomarcadores que permitam identificar as alterações celulares associadas ao processo neoplásico em amostras histológicas ou citológicas, e que possam contribuir ao aumento da eficiência dos métodos de diagnóstico citopatológico e histopatológico, na detecção de lesões com maior risco de progressão (DOEBERITZ, 2002).

Diversos estudos desenvolvidos na literatura indicam que a neoplasia cervical está intimamente relacionada à infecção persistente por HPVs de alto risco (revisão em BOSCH & SANJOSÉ, 2002; zur HAUSEN, 2002). Tal evento parece estar associado à replicação desregulada do genoma do hospedeiro e assim, diversas proteínas envolvidas no controle do ciclo celular podem apresentar seus níveis aumentados ou diminuídos em ocorrência dessa infecção. Dessa forma, vários estudos direcionados à identificação de biomarcadores relacionados à progressão do câncer cervical, visam a análise dos níveis de proteínas relacionadas a este evento.

Considerando a importância da biologia da infecção pelo HPV na progressão das lesões intraepiteliais cervicais, investigou-se, no presente estudo, o padrão de expressão de uma proteína associada à infecção pelo vírus (p16<sup>INK4a</sup>) e de dois marcadores de proliferação celular (Ki-67 e MCM7), em 80 amostras cervicais sem alterações patológicas ou classificadas histopatologicamente como portadoras de graus subsequentes de progressão neoplásica.

Por meio da técnica de Imunofluorescência Indireta, realizou-se a análise quantitativa dos biomarcadores acima relacionados, considerando-se os seguintes parâmetros: a área de expressão, a distribuição de células e/ou núcleos positivos e a topografia da expressão de cada marcador.

Em relação aos estudos desenvolvidos na literatura que foram dedicados à identificação de biomarcadores do câncer cervical e das lesões associadas, destaca-se que a maioria desses estudos foi direcionada à avaliação dos níveis da proteína p16<sup>INK4a</sup> em amostras do colo uterino, tanto em cortes histológicos quanto em amostras derivadas de esfregaços cervicais (revisão em KALOF *et al.*, 2006 e em TSOUMPOU *et al.*, 2009).

No presente estudo não foi observada nenhuma área positiva ou células imunorreativas para p16<sup>INK4a</sup>, nas amostras de tecido cervical normal analisadas. Da mesma forma, verificou-se uma ausência de p16<sup>INK4a</sup> na mucosa cervical normal na grande maioria dos estudos já realizados (KLAES *et al.*, 2001; SANO *et al.*, 2002; MURPHY *et al.*, 2003; BRANCA *et al.*, 2004; VOLGAREVA *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2005; LORENZATO *et al.*, 2005; HU *et al.*, 2005; BAHNASSY *et al.*, 2006; BENEVOLO *et al.*, 2006; BAHNASSY *et al.*, 2007; ELEUTÉRIO JR *et al.*, 2007; LESNIKOVA *et al.*, 2009; WALTS *et al.*, 2009; MISSAOUI *et al.*, 2010; SRIVASTAVA, 2010; UNGUREANU *et al.*, 2010). Esses resultados são condizentes com o fato de que a superexpressão da proteína p16<sup>INK4a</sup> é encontrada em células epiteliais displásicas mas não em células epiteliais normais, onde o nível da proteína é mantido baixo, em decorrência da sua função na regulação do ciclo celular (KLAES *et al.*, 2001; LESNIKOVA *et al.*, 2009; MISSAOUI *et al.*, 2010). Entretanto, estes resultados diferem de alguns estudos onde a proteína p16<sup>INK4a</sup> foi detectada mesmo em amostras de tecido cervical normal. Nesses casos, existe a possibilidade de que a biópsia não tenha sido extraída de uma área representativa da lesão e que por esta razão, a área de NIC não tenha sido reconhecida pelo patologista (KEATING *et al.*, 2001; AGOFF *et al.*, 2003; WANG JL *et al.*, 2004; WANG S *et al.*, 2004; ISHIKAWA *et al.*, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2006; SALCEDO *et al.*, 2008; GUPTA *et al.*, 2010; OZAKI *et al.*, 2011).

Embora a grande maioria dos estudos direcionados à análise da expressão de p16<sup>INK4a</sup> nas lesões intraepiteliais reporte a elevada expressão da proteína nas lesões intraepiteliais de alto grau e a ausência ou baixa expressão no epitélio cervical normal, a maior variação na expressão da proteína (2 a 100%) se encontra dentro do grupo de NIC I (Quadro 2).

Pela análise das amostras de lesões de baixo grau, nossos dados mostraram que 71% das amostras de NIC I apresentaram positividade para p16<sup>INK4a</sup>. Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo que avaliou um grande número de amostras pela técnica de Imunohistoquímica, desenvolvido por Lesnikova e colaboradores (2009). Nesse trabalho a expressão de p16<sup>INK4a</sup> foi analisada em 806 biópsias cervicais, onde 72% das amostras de NIC I apresentaram positividade para a proteína. Outros estudos também relatam uma taxa (67%) de expressão de p16<sup>INK4a</sup> em lesões de baixo grau, semelhante àquela encontrada em nosso estudo (BULTEN *et al.*, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2006). A variação observada na imunorreatividade de p16<sup>INK4a</sup> em amostras de NIC I, pode representar uma diferença na agressividade destas lesões, e refletir a presença de diferentes estados físicos do genoma do HPV (KALOF *et al.*, 2006). Os últimos autores sugeriram que a expressão de p16<sup>INK4a</sup> em amostras de NIC I pode estar relacionada à persistência da infecção pelo HPV, e ainda que, amostras de NIC I exibindo altos níveis de p16<sup>INK4a</sup> exibiriam uma grande proporção do genoma do HPV integrado, de forma que a expressão da proteína poderia ser considerada como um potencial marcador para a progressão maligna (KALOF *et al.*, 2006). A variabilidade substancial dos resultados observados em lesões de baixo grau, também poderia estar relacionada ao número de amostras analisadas, à inerente e inevitável variação inter-observador, aos diferentes tipos de anticorpos monoclonais usados e à falta de padronização nos critérios de marcação de p16<sup>INK4a</sup> adotados em diferentes estudos (VOLGAREVA *et al.*, 2004; TSOUMPOU *et al.*, 2009).

No presente trabalho, observou-se um aumento significativo na área de expressão, assim como na distribuição de células e/ou núcleos positivos para p16<sup>INK4a</sup> de acordo com o grau de severidade das lesões cervicais. Tais achados são semelhantes aos observados na grande maioria dos estudos descritos na literatura (Quadro 2). Em uma revisão sistemática e de meta-análise conduzida por Tsoumpou e colaboradores (2009), onde foi avaliada em 61 estudos a expressão de p16<sup>INK4a</sup> em amostras citológicas e histológicas do colo uterino estratificadas pelo grau da lesão, encontrou-se uma correlação satisfatória entre a imunoeexpressão deste marcador com a progressão das lesões cervicais. Em um estudo realizado em biópsias provenientes de indivíduos da população brasileira, Queiroz e



colaboradores (2006) também mostraram que a expressão de p16<sup>INK4a</sup> estava aumentada no carcinoma invasivo comparado ao tecido normal. Da mesma forma, em estudos desenvolvidos mais recentemente, verificou-se que a expressão de p16<sup>INK4a</sup> estava significativamente associada com o grau da neoplasia cervical (GUPTA *et al.*, 2010; MISSAOUI *et al.*, 2010; TAN *et al.*, 2010; SRIVASTAVA, 2010; UNGUREANU *et al.*, 2010; OZAKI *et al.*, 2011; REUSCHEBACH *et al.*, 2011; ZENG *et al.*, 2011). Os resultados obtidos nesse estudo apoiam claramente aqueles observados em publicações anteriores, nos quais observou-se que a proteína p16<sup>INK4a</sup> apresentou-se superexpressa no epitélio cervical displásico (Quadro 2).

A utilização da expressão de p16<sup>INK4a</sup> como biomarcador de progressão das lesões cervicais, tem sido sugerida por diversos estudos. Alguns autores relatam que uma forte imunoe expressão de p16<sup>INK4a</sup> pode ser considerada um excelente marcador para neoplasia intraepitelial de alto grau e lesões potencialmente progressivas enquanto que a completa ausência de p16<sup>INK4a</sup> pode ser utilizada para eliminar um possível diagnóstico de lesão intraepitelial de alto grau em biópsias cervicais (KLAES *et al.*, 2001; DRAY *et al.*, 2005; GUIMARÃES *et al.*, 2005; QUEIROZ *et al.*, 2006; NAM *et al.*, 2008; GUPTA *et al.*, 2010; MISSAOUI *et al.*, 2010; OZAKI *et al.*, 2011; REUSCHENBACH *et al.*, 2011). Branca e colaboradores (2004) reportaram uma relação quase linear, entre o padrão de expressão de p16<sup>INK4a</sup> e o grau da neoplasia cervical. No entanto, em contraste com os nossos resultados e a maioria daqueles descritos na literatura, os autores encontraram um significativo número de casos de neoplasia cervical e de carcinoma de células escamosas negativos para p16<sup>INK4a</sup>, resultando em um baixo valor preditivo negativo para esse biomarcador. Em um estudo desenvolvido por Kang e colaboradores (2006) observou-se que 35,7% e 28% dos casos de NIC II e NIC III, respectivamente, foram negativos para a expressão da proteína p16<sup>INK4a</sup>. A ausência de imunorreatividade foi relacionada à hipermetilação do promotor do gene da proteína. Os autores relataram que o silenciamento do gene *p16* durante o processo de neoplasia cervical não seria um evento raro, e também não estaria associado ao estado físico do HPV ou ao grau da neoplasia. Diante desses fatos, Volgareva e colaboradores (2004) sugerem que a negatividade para p16<sup>INK4a</sup> não seria razão suficiente para se excluir uma paciente do grupo de alto risco para a progressão das lesões intraepiteliais.

Em relação à topografia da expressão de p16<sup>INK4a</sup> no epitélio cervical, observou-se em nosso estudo, que a maioria dos casos de NIC I e NIC II apresentou marcação nos 2/3 basais, enquanto que a maioria dos casos de NIC III exibiu marcação de toda a espessura do epitélio

cervical. Os resultados obtidos nesse estudo para as amostras de NIC II e NIC III, estão em concordância com a maioria dos estudos descritos na literatura, onde é reportado que amostras provenientes desses grupos apresentam uma marcação forte e difusa para p16<sup>INK4a</sup> acima do terço basal do epitélio. Porém, quanto às amostras de NIC I, os dados do presente estudo não corroboram com a conclusão proposta por esses autores, onde a presença da imunorreatividade para p16<sup>INK4a</sup> no terço basal do epitélio é altamente sugestiva da presença de lesões de baixo grau (KLAES *et al.*, 2001; AGOFF *et al.*, 2003; ISHIKAWA *et al.*, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2006; YILDIZ *et al.*, 2007; MISSAOUI *et al.*, 2010).

Como destacado na Introdução do presente estudo, a superexpressão de p16<sup>INK4a</sup> tem sido diretamente associada à atividade oncogênica dos HPVs de alto risco. Sabe-se que a proteína E7 dos HPVs de alto risco é capaz de se ligar e promover a degradação de pRb, interrompendo a ligação da proteína do retinoblastoma (pRb) com o fator de transcrição E2F. Esta interferência ativaria um processo de retro-alimentação negativo que resultaria na expressão exacerbada de p16<sup>INK4a</sup>, que é uma proteína inibitória dos complexos de quinase dependentes de ciclina (CDKs) (Fig. 10 B e C) (DOEBERITZ, 2002; MURPHY *et al.*, 2005; KALOF *et al.*, 2005; NAM *et al.*, 2008; THOMISON *et al.*, 2008).

Vários estudos foram dedicados à análise de p16<sup>INK4a</sup> como um biomarcador específico de células infectadas por HPVs de alto risco (KEATING *et al.*, 2001; DOEBERITZ, 2002), e os resultados provenientes desses estudos sugerem que a expressão da proteína p16<sup>INK4a</sup> pode ser considerada um excelente marcador de lesões cervicais infectadas por HPVs de alto risco (Quadro 3). No presente estudo observou-se uma correlação significativa da expressão da proteína p16<sup>INK4a</sup> com a presença do DNA do HPV (P<0.05), verificando-se que 54% das amostras positivas para p16<sup>INK4a</sup> também foram positivas para o DNA viral.

Contudo, observou-se uma superexpressão de p16<sup>INK4a</sup> em 33% das amostras que não apresentaram amplificação positiva para o HPV. Duas hipóteses podem ser postuladas para explicar os últimos resultados. A primeira pode ser devido à deficiência na detecção do DNA do HPV, possivelmente causada pela presença de inibidores nas amostras analisadas, à degradação do DNA extraído das amostras, à perda de uma região genômica do DNA viral ou pela presença de um novo subtipo desconhecido do HPV (CHOO *et al.*, 1988; POLJAK *et al.*, 2000). A segunda hipótese poderia estar relacionada à presença de uma via de carcinogênese independente do HPV que levaria a uma superexpressão de p16<sup>INK4a</sup>, como a inativação do gene de pRb ou o acúmulo de proteínas p16<sup>INK4a</sup> relativamente estáveis em células fortemente

proliferativas (MILDE-LANGOSCH *et al.*, 2001). Também observou-se que em 7% das amostras que foram positivas para o HPV, não houve expressão da proteína p16<sup>INK4a</sup>. A falta de imunorreatividade para p16<sup>INK4a</sup> em algumas lesões positivas para o HPV poderia ser explicada pelas seguintes considerações. Como reportado em outros tipos de tumores (KAWAGUCHI *et al.*, 2003; ESPOSITO *et al.*, 2004; GHIORZO *et al.*, 2004), a presença de mutações no gene *p16<sup>INK4a</sup>*, ou de deleção ou hipermetilação do promotor desse gene poderia inibir a expressão da proteína p16<sup>INK4a</sup>, embora na carcinogênese cervical essas alterações sejam consideradas eventos raros. Além disso, embora o DNA do papilomavírus humano seja detectado, o vírus poderia estar inativo, a infecção viral poderia ser recente ou o vírus poderia estar defeituoso. Em todos esses casos, a transcrição das oncoproteínas E6 e E7 poderia estar comprometida e conseqüentemente a via pRb-p16 não seria afetada, resultando na ausência da superexpressão da proteína p16<sup>INK4a</sup> (zur HAUSEN, 1999; FERHMANN *et al.*, 2003; BENEVOLO *et al.*, 2006).

Quanto à associação dos tipos de HPVs com o nível de expressão de p16<sup>INK4a</sup> observou-se, no presente estudo, uma correlação significativa entre a presença dos HPVs de alto risco 16 e 18 e a superexpressão da proteína p16<sup>INK4a</sup>, resultados esses também relatados em outros estudos. A fim de se comparar a atividade oncogênica de vários subtipos de HPVs de alto risco (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 51, 52, 56) com a superexpressão de p16<sup>INK4a</sup>, Ishikawa e colaboradores (2006) encontraram uma associação positiva entre todos os subtipos de HPV analisados e a expressão de p16<sup>INK4a</sup>. Outros autores também relataram que o nível de expressão de p16<sup>INK4a</sup> encontrava-se aumentado em pacientes infectadas pelo HPV 16 (AGOFF *et al.*, 2003; GUIMARÃES *et al.*, 2005; MURPHY *et al.*, 2005; NAM *et al.*, 2008) e pelo HPV 18 (GUIMARÃES *et al.*, 2005). Os últimos autores concluíram que os HPVs 16 e 18 estão envolvidos na superexpressão de p16<sup>INK4a</sup> e associados com a progressão das lesões intraepiteliais cervicais, sugerindo que a avaliação Imunohistoquímica de p16<sup>INK4a</sup>, pode ser considerada como um biomarcador efetivo para a malignidade progressiva em lesões cervicais associadas ao HPV de alto risco. Os resultados obtidos no nosso e em estudos anteriores, corroboram a hipótese de que a superexpressão de p16<sup>INK4a</sup> estaria relacionada à presença da infecção por HPVs de alto risco e, possivelmente, à conseqüente ação das oncoproteínas virais.

Diante do exposto, nossos dados suportam a evidência de que a avaliação da infecção por HPVs de alto risco assim como a imunorreatividade de p16<sup>INK4a</sup>, podem ser consideradas

importantes ferramentas e de particular valor clínico, na identificação de casos com uma alta tendência de progressão para lesões de alto grau.

A utilização de marcadores de proliferação para se averiguar a progressão e o nível de malignidade de diversos tipos de neoplasias, incluindo o câncer cervical, tem sido amplamente empregada (KEATING *et al.*, 2001; KRUSE *et al.*, 2001; AGOFF *et al.*, 2003; KALOF *et al.*, 2006; SONG *et al.*, 2007; NAM *et al.*, 2009, WALTERS *et al.*, 2009).

A avaliação de células positivas para Ki-67 no epitélio cervical é considerada por muitos autores como ferramenta complementar ao diagnóstico histopatológico, que pode ser usada para distinguir diferentes graus de lesões cervicais. A imunopositividade para Ki-67 parece refletir a relação entre a ação proliferativa, o grau da neoplasia e a presença do HPV (KRUSE *et al.*, 2001). Diversos estudos mostraram que a expressão de Ki-67 está significativamente associada ao grau da severidade das lesões cervicais (KRUSE *et al.*, 2001; AGOFF *et al.*, 2003; LONGATTO FILHO *et al.*, 2005; LORENZATO *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2007; WALTERS *et al.*, 2009). Em concordância com tais achados, no presente estudo verificou-se que o número de núcleos positivos para Ki-67, aumentou consideravelmente do epitélio normal para as NICs III.

Em relação à topografia da expressão de Ki-67 observou-se em nosso estudo o mesmo padrão de distribuição relatado para p16<sup>INK4a</sup>, onde a maioria dos casos de NIC I e NIC II apresentou marcação nos 2/3 basais, enquanto a maioria dos casos de NIC III mostrou marcação em toda a espessura do epitélio cervical. Outros estudos também reportaram, que as lesões de alto grau exibiram uma distribuição da expressão de Ki-67 nas camadas superiores do epitélio cervical. No entanto quanto às lesões de baixo grau, a maioria dos autores observou que a marcação de Ki-67 estaria restrita ao terço basal do epitélio (KRUSE *et al.*, 2001; AGOFF *et al.*, 2003; NAM *et al.*, 2008). A presença de células positivas para Ki-67 nas camadas superiores do epitélio cervical nas lesões de alto grau, parece indicar a perda dos mecanismos do controle de proliferação. Diante dessas considerações, a distribuição da expressão de Ki-67 parece refletir o início e o término da expressão viral nas camadas epiteliais, o que pode ser explicado pela mudança topográfica na expressão das oncoproteínas virais E6/E7 ao longo do epitélio cervical (KRUSE *et al.*, 2001).

Alguns estudos foram dedicados à comparação da expressão de p16<sup>INK4a</sup> e Ki-67 em amostras cervicais. Keating e colaboradores (2001) ao examinar e comparar a distribuição de Ki-67, Ciclina E e p16<sup>INK4a</sup>, relataram uma forte relação entre os marcadores e as lesões pré-invasivas associadas ao HPV. Baseado neste estudo, a marcação positiva acima dos dois

terços do epitélio foi considerada um forte indicador de lesão cervical de alto grau. No entanto a ausência de Ki-67 nas camadas superiores não foi considerada suficiente para se excluir uma possível lesão de baixo grau, ou seja, a marcação para Ki-67 poderia estar presente nas células basais do epitélio cervical e, no entanto, não seria capaz de discriminar as lesões de baixo grau do epitélio normal. Ao comparar a expressão dos marcadores p16<sup>INK4a</sup> e Ki-67, outros dois estudos concluíram que Ki-67 era menos específico do que p16<sup>INK4a</sup> para o diagnóstico de lesões cervicais. No entanto, quando os dois marcadores eram utilizados em conjunto observou-se um aumento na sensibilidade e especificidade dos marcadores (AGOFF *et al.*, 2003; VAN NIERKERK *et al.*, 2007).

Ao realizar a investigação da presença do DNA do HPV em comparação a expressão de Ki-67, no presente trabalho, não pôde ser observada uma correlação significativa entre a expressão da proteína e a infecção pelo HPV. Ao encontrar dados semelhantes, Nam e colaboradores (2008) sugerem que, embora Ki-67 possa ser utilizado como um excelente marcador de proliferação, é provável que a proteína não tenha um papel fundamental no desenvolvimento do câncer cervical. Em contraste, com os resultados encontrados em nosso estudo, alguns autores verificaram uma correlação significativa entre a infecção por HPVs de alto risco e um elevado nível de expressão da proteína Ki-67 (AGOFF *et al.*, 2003; SONG *et al.*, 2007). Em concordância com os últimos trabalhos, Kruse e colaboradores (2001) também observaram que as características de marcação de Ki-67 eram fortemente preditivas da presença do HPV, mesmo em diferentes graus de neoplasia cervical. Essa correlação pode ser explicada pelo fato de que a infecção pelo HPV ativaria a progressão do ciclo celular, uma vez que as oncoproteínas virais E6 e E7 atuam na desregulação de genes que controlam a proliferação celular, fato que conseqüentemente levaria a um aumento na expressão da proteína Ki-67.

No presente estudo também avaliou-se, em amostras cervicais, a expressão de um outro marcador de proliferação celular, a proteína MCM7. Nesse trabalho observou-se que os índices de marcação (LIs) de MCM7 e Ki-67 obtidos em lesões de alto grau (NIC II e III), foram maiores do que aqueles verificados em amostras de NIC I e no epitélio cervical normal.

Em relação à expressão de MCM7 em tecido normal, nossos resultados são concordantes com estudos prévios que mostraram que a expressão de MCM 2, 5 e 7 foi restrita a regiões proliferativas normais da epiderme, da cérvix, do intestino e de tecidos linfóides (HIRAIWA *et al.*, 1997; TODOROV *et al.*, 1998; FREEMAN *et al.*, 1999). Estudos anteriores também verificaram que as proteínas MCM incluindo a MCM7, foram detectadas

mais frequentemente em células neoplásicas do que em células não neoplásicas, sugerindo que as MCMs poderiam ser utilizadas como indicadores úteis de proliferação celular (HIRAIWA *et al.*, 1997; TODOROV *et al.*, 1998; WILLIAMS *et al.*, 1998). Porém, nenhum desses estudos realizou a comparação dos dados obtidos com MCM7, com os resultados obtidos com o também marcador de proliferação Ki-67. Além disso, verificou-se nesse estudo, certa sobreposição do padrão de expressão de MCM7 em relação àquele de Ki-67, resultados esses condizentes com outros trabalhos da literatura (BURGUER *et al.*, 1986; BROWN *et al.*, 1990; revisão em REMUS *et al.*, 2009 e em BLOW & DUTTA, 2002). Esses resultados indicam que, embora essas duas proteínas sejam remotamente relacionadas, ambas são associadas com a duplicação do DNA (BURGUER *et al.*, 1986; BLOW & DUTTA, 2002) e, possivelmente por essa razão, exibiram um padrão de expressão similar, fato que sugere a especificidade dos achados de nosso trabalho, que foram obtidos por meio da análise e utilização de alvos diferentes.

A expressão aumentada de proteínas MCMs já foi verificada na maioria de tumores sólidos e estados proliferativos pré-malignos (HIRAIWA *et al.*, 1997; WILLIAMS *et al.*, 1998; FREEMAN, *et al.*, 1999; BRAKE *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2005; NISHIHARA *et al.*, 2008; FUJIOKA *et al.*, 2009). Como anteriormente mencionado, numerosos artigos desenvolvidos nos últimos 20 anos foram dedicados à avaliação de Ki-67 como marcador de proliferação potencial na progressão da doença cervical (KRUSE *et al.*, 2001; AGOFF *et al.*, 2003; LONGATTO FILHO *et al.*, 2005; LORENZATO *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2007; NAM *et al.*, 2008; WALTS *et al.*, 2009). Entretanto, só alguns estudos foram direcionados à análise da expressão de proteínas MCMs em tecidos da cérvix uterina humana (WILLIAMS *et al.*, 1998; FREEMAN *et al.*, 1999) ou de linhagens celulares derivadas desse sítio (ISHIMI *et al.*, 2003). Além disso, a maioria desses trabalhos analisaram predominantemente a imunexpressão das proteínas MCM2 e MCM5 (WILLIAMS *et al.*, 1998; FREEMAN *et al.*, 1999). Apenas alguns trabalhos analisaram a expressão de MCM7 em tecidos cervicais de pacientes (BRAKE *et al.*, 2003; MIDDLETON *et al.*, 2003) e de camundongos (BRAKE *et al.*, 2003; HONEYCUTT *et al.*, 2006), e em linhagens celulares derivadas da cérvix (ISHIMI *et al.*, 2003). O estudo desenvolvido por Freeman e colaboradores (1999) investigou o estado proliferativo de 204 amostras de tecidos humanos (correspondente a tecidos normais, hiperplasias, displasias e neoplasias) de vários sítios anatômicos incluindo 48 tecidos da cérvix uterina (13 amostras de tecido normal, 08 de NIC I, 21 de NIC III e 06 de câncer). Esses autores verificaram aumento da expressão das MCMs 2 e 5 em lesões de alto grau em

comparação a lesões de baixo grau. Porém, não foi avaliado nesse estudo (FREEMAN *et al.*, 1999) e nem em trabalho anterior do mesmo grupo (WILLIAMS *et al.*, 1998), o padrão de marcação de MCM7 em lesões progressivas da cérvix uterina.

Um outro estudo investigou o padrão de expressão de MCM7 em tecidos cervicais obtidos de pacientes humanos, e de camundongos transgênicos com elevada expressão da proteína E7 do HPV 16 (BRAKE *et al.*, 2003). No modelo murino, MCM7 foi altamente expressa tanto em lesões de alto grau quanto em tumores cervicais induzidos pela oncoproteína E7, exibindo um padrão de expressão muito similar àquele observado na doença cervical humana (BRAKE *et al.*, 2003). O último estudo foi um dos poucos a avaliar a expressão de MCM7 ao longo do epitélio cervical, em tecidos de pacientes com epitélio normal ou apresentando doença cervical progressiva. As 13 amostras de tecido normal avaliadas exibiram expressão positiva de MCM7 no terço basal do epitélio, enquanto que as amostras correspondentes aos grupos de lesão apresentaram o seguinte padrão de distribuição da proteína: 100% das 07 LBG mostraram marcação de 1/3 do epitélio, 33% e 66% das 06 amostras de LAG exibiram marcação de 2/3 e 3/3 do epitélio e a totalidade das 08 amostras de câncer apresentaram marcação de 3/3 do epitélio (BRAKE *et al.*, 2003). Da mesma forma, Middleton e colaboradores (2003) observaram resultados semelhantes ao último trabalho, ao avaliar o padrão de expressão de MCM7 em amostras de câncer cervical.

Em relação ao padrão de expressão dos marcadores p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7 ao longo do epitélio cervical, os resultados obtidos nesse estudo estão de acordo com aqueles verificados por Brake e colaboradores (2003), com significativa associação da expressão topográfica dessas moléculas através do epitélio da cérvix, de acordo com a progressão e severidade da doença cervical humana.

No presente estudo, observou-se uma maior proporção de células positivas para MCM7 do que Ki-67 em todas as categorias celulares, desde o epitélio normal até amostras correspondentes a NIC III. Esses achados são concordantes com outros estudos, que examinaram a expressão de MCM7 em vários tipos de lesões pré-malignas e câncer, e mostraram que os índices de marcação (LIs) de MCM7 foram consistentemente maiores do que os LIs de Ki-67 em displasias (BRAKE *et al.*, 2003; PADMANABHAN *et al.*, 2004; GAMBICHLER *et al.*, 2009; TAMURA *et al.*, 2010) e diversos tipos de câncer incluindo o cervical (BRAKE *et al.*, 2003; MIDDLETON *et al.*, 2003), o endometrial (LI *et al.*, 2003), o de próstata (PADMANABHAN *et al.*, 2004), o coloretal (NISHIHARA *et al.*, 2008), o de pulmão (FUJIOKA *et al.*, 2009) e o carcinoma oral (TAMURA *et al.*, 2010). Estudos prévios

mostraram que MCMs foram expressas não só em células proliferativas, mas também em células que se encontravam no início do processo de proliferação, ou seja, com potencial para proliferarem (STOEBER *et al.*, 2001; TACHIBANA *et al.*, 2005). A expressão de Ki-67 é observada em todas as fases do ciclo celular com exceção de G0 e no início de G1 (SCHOLZEN & GERDES, 2000). Essas observações sugerem que os valores mais elevados de LI de MCM7 em comparação àqueles apresentados por Ki-67, podem ser resultantes do fato de que essa molécula não é capaz de marcar todas as células em proliferação em um dado tumor, incluindo aquelas que se encontrem na transição da fase G0 para G1 (TODOROV *et al.*, 1998; TYE, 1999, SCHOLZEN & GERDES, 2000).

Corroborando com a hipótese anterior, estudos prévios mostraram que as proteínas MCM são expressas não só em células com elevada capacidade de proliferação, mas também naquelas com menor taxa de proliferação, como ovócitos primários e células de glândulas mamárias pré-menopausa (EWARD *et al.*, 2004). Além disso, alguns trabalhos identificaram células que apresentam o fenótipo de marcação positiva para MCM7 e negativa para Ki-67 (MCM7+ / Ki67-), que são consideradas como células “licenciadas” a proliferar, mas que ainda não se encontram em estado de proliferação. O aumento dessa população celular exibiu correlação positiva com o grau de severidade dos tumores renal (DUDDERIDGE *et al.*, 2005), de próstata (DUDDERIDGE *et al.*, 2007), oligodendroma (WHARTON *et al.*, 2007) e carcinoma coloretal (NISHIHARA *et al.*, 2008).

A proliferação celular consiste em fator preditivo útil para a progressão maligna de doenças (BOSTWICK *et al.*, 1998). A categorização de pacientes em grupos de risco, permite ao clínico obter maiores subsídios para decisões acerca da conduta e tratamento oncológicos, de maneira que diversos estudos foram direcionados à análise de MCM7 como marcador prognóstico em alguns tipos de tumores. Enquanto que em alguns trabalhos observou-se uma associação entre os índices de marcação (LIs) de MCM7 com o grau de severidade ou com o prognóstico da neoplasia, em outros estudos essa correlação não foi verificada.

Padmanabhan e colaboradores (2004) avaliaram a correlação existente entre os índices de marcação (LIs) de MCM7 e de Ki-67 e as características histopatológicas do tumor de próstata, como os níveis de PSA, graduação e estágio do tumor e status da re-seção de margens cirúrgicas. Os LIs de MCM7 foram mais elevados do que aqueles correspondentes a Ki-67, em cada uma das categorias de risco (PADMANABHAN *et al.*, 2004). Um outro estudo também avaliou a significância de MCM7 como marcador prognóstico do carcinoma endometrial (LI *et al.*, 2005). Pacientes com valores elevados de LI de MCM7 apresentaram



menor taxa de sobrevivência. Além disso, o LI de MCM7 demonstrou correlação inversa com o grau de diferenciação dos tumores, ou seja, observou-se maior nível de proliferação em tumores de estágios mais avançados (estágios II e III). Entretanto, não foi verificada associação da expressão de MCM7 com outros importantes aspectos histopatológicos do carcinoma endometrial como o subtipo e o estágio clínico do tumor, a invasão do miométrio e a presença de metástases em linfonodos (LI *et al* 2005). Nishihara e colaboradores (2008) avaliaram o potencial de MCM7 como marcador prognóstico do câncer colorretal. Esses autores demonstraram que o LI de células com o fenótipo MCM+ / Ki67- apresentou correlação positiva com a presença de metástases e com o estágio dos tumores: tumores em estágios mais avançados apresentaram valores mais elevados de LIs das populações MCM+ / Ki67- . A expressão de MCM7 foi considerada um fator prognóstico independente no carcinoma colorretal (NISHIHARA *et al.*, 2008). Da mesma forma, ao analisarem a expressão de MCM7 como fator prognóstico do adenocarcinoma de pulmão, Fujioka e colaboradores (2009) observaram que os LIs de MCM7 exibiram correlação significativa com as características histopatológicas dos tumores, como o grau histológico, o subtipo e o tamanho do tumor. Todos os pacientes que apresentaram elevados LIs de MCM7, exibiram um pobre prognóstico e menor taxa de sobrevivência. A expressão de MCM7 foi considerada um fator prognóstico independente no adenocarcinoma de pulmão (FUJIOKA *et al.*, 2009).

Com base na observação de que uma expressão elevada de MCM7 foi verificada em múltiplos tipos de neoplasia (HIRAIWA *et al.*, 1997; FREEMAN, *et al.*, 1999; BRAKE *et al.*, 2003; *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2005; NISHIHARA *et al.*, 2008; FUJIOKA *et al.*, 2009) e de linhagens celulares tumorais (ISHIMI *et al.*, 2003; NISHIHARA *et al.*, 2008) em numerosos estudos, levantou-se a hipótese de que essa proteína poderia ter um papel ativo no processo de carcinogênese. Além disso, estudos demonstraram que MCM7 é capaz de interagir com diversas proteínas envolvidas no controle da proliferação celular como p27<sup>kip1</sup> (NALLAMSHETTY *et al.*, 2005). Esses autores verificaram que, através da interação direta com MCM7, p27<sup>kip1</sup> foi capaz de regular a progressão de G1 para S, além de exercer o controle sobre a replicação do DNA. Da mesma forma, é bem documentada a interação de MCM7 com proteínas envolvidas no controle da regulação gênica, como os fatores de transcrição MYC (SHOHET *et al.*, 2002) e E2F (SUZUKI *et al.*, 1998; ISHIDA *et al.*, 2001). Destaca-se que MCM7 é o único membro da família cujo promotor contém uma sequência “E-box”, que consiste no sítio de ligação para os membros da família de oncogenes MYC. Assim, MCM7 é um alvo direto para ambas as proteínas, MYCC e MYCN (FERNANDEZ *et*

*al.*, 2003; SHOHET *et al.*, 2002). Em neuroblastoma, a regulação da transcrição de MCM7 é exercida por MYCN, e um aumento da expressão de MCM7 foi observada em tumores mais agressivos, que apresentavam amplificação do gene *MYCN* (SHOHET *et al.*, 2002).

Poucos estudos utilizando o modelo animal, foram direcionados à investigação do possível papel de MCM7 no processo de tumorigênese. Honeycutt e colaboradores (2006) utilizaram camundongos transgênicos apresentando expressão desregulada de MCM7, direcionada à camada basal da epiderme pelo emprego do promotor de queratina 14 (transgênico K14.MCM7), que é expressa somente em keratinócitos basais da epiderme e de folículos pilosos. Quando sujeitos a um protocolo de carcinogênese química, camundongos K14.MCM7 mostraram aumento na incidência e prevalência no desenvolvimento de tumor de pele em comparação aos controles: cerca de 45% dos transgênicos exibiram tumores que haviam convertido para carcinoma de células escamosas, em comparação a nenhum dos animais do grupo controle. Além disso, acima de 90% dos tumores isolados apresentavam mutações no oncogene *Ras*, levando os autores à suposição de que, além da primordial função em participar do complexo de licenciamento de duplicação do DNA, MCM7 poderia contribuir com o processo de tumorigênese de células epidérmicas da pele, iniciado pela oncoproteína *Ras* (HONEYCUTT *et al.*, 2006).

Por meio da utilização de camundongos transgênicos apresentando uma superexpressão da proteína E7 do HPV 16 em células epiteliais progenitoras, Brake e colaboradores (2003) demonstraram uma correlação direta entre a função de MCM7 e o desenvolvimento da doença cervical. No último estudo, a expressão de MCM7 foi verificada durante o desenvolvimento progressivo de lesões cervicais, que normalmente surgem em camundongos transgênicos expressando E7 do HPV 16. Considerando que (i) a proteína E7 de HPVs de alto risco é capaz de inativar a pRb, a proteína supressora de tumor que modula a atividade da família de genes controlada pelo fator de transcrição E2F (zur HAUSEN, 2000), e que como já mencionado, (ii) o gene de MCM7 é um gene responsivo a E2F (SUZUKI *et al.*, 1998; ISHIDA *et al.*, 2001), os autores hipotetizaram que o aumento de expressão de E2F e MCM7 poderia estar diretamente envolvido com a síntese de DNA que ocorre no compartimento supra-basal do epitélio cervical infectado pelo HPV. Conseqüentemente, a expressão de MCM7 poderia contribuir ao aumento da proliferação celular nas lesões pré-neoplásicas e no câncer cervical (BRAKE *et al.*, 2003).

Em outro trabalho direcionado à análise da expressão de MCM7 em câncer de próstata, observou-se amplificação do gene de *MCM7* em elevada proporção de espécimes de

tumor (REN *et al.*, 2006). Os autores concluíram que essa amplificação gênica seria responsável pela superexpressão de MCM7 observada e fortemente relacionada com um fenótipo mais agressivo e com a progressão da doença (REN *et al.*, 2006).

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

A utilização de MCMs, e em especial de MCM7, como marcador de proliferação oferece algumas vantagens sobre outros indicadores de proliferação, como PCNA e Ki-67. Como mencionado, o antígeno Ki-67 está ausente em uma proporção de células de cada fase do ciclo celular incluindo a fase S, e é frequentemente expresso em um número menor de células malignas ou pré-malignas do que MCM7, em uma ampla variedade de sítios anatômicos (HIRAWA *et al.*, 1997; WILLIAMS *et al.*, 1998; FREEMAN *et al.*, 1999; BRAKE *et al.*, 2003; *et al.*, 2004; PADMANABHAN *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2005; NISHIHARA *et al.*, 2008; FUJIOKA *et al.*, 2009; TAMURA *et al.*, 2010). Além disso, Ki-67 apresenta baixa especificidade na detecção de progressão de lesões cervicais (AGOFF *et al.*, 2003). Por sua vez, o antígeno PCNA está envolvido no reparo do DNA, oferecendo assim menor especificidade para a detecção de células cancerosas (HALL *et al.*, 1990).

Uma das principais vantagens de MCM7 reside no fato de que a proteína constitui parte essencial do complexo pré-replicativo, com importante função no processo de “licenciamento” da duplicação do DNA, cuja presença tem sido bem caracterizada através de todo o ciclo celular (BELL & DUTTA, 2002; BLOW e DUTTA 2005). Além disso, MCMs representam o ponto de convergência de numerosas vias de sinalização envolvidas no crescimento celular (ROMANOWSKI *et al.* 1997), e portanto, constituem melhores marcadores de células que estejam no ciclo celular do que outros possíveis candidatos, como receptores de fatores de crescimento ou moléculas envolvidas na transdução de sinal (ROMANOWSKI *et al.* 1997). Do ponto de vista técnico, há disponibilidade de anticorpos para todos os tipos de MCMs, que tem sido considerados superiores do que anticorpos dirigidos a Ki-67, para a avaliação de compartimentos proliferativos em ambos tecidos, normais e anormais (WILLIAMS *et al.*, 1998, FREEMAN *et al.*, 1999; CHATRAT *et al.*, 2004; XUE *et al.*, 2003).

Com base nessas considerações, as proteínas MCM com destaque para MCM7, têm sido consideradas excelentes marcadores para triagem e prognóstico do câncer (PADMANABHAN et al., 2004; LI et al., 2005; NISHIHARA et al., 2008; FUJIOKA et al., 2009).

Conclui-se, portanto, no presente estudo, que as proteínas p16<sup>INK4a</sup> e MCM7 podem ser consideradas excelentes marcadores de progressão das lesões cervicais, associadas ao papilomavírus humano, cuja utilização poderia implementar os métodos de diagnóstico histopatológico, principalmente na discriminação entre lesões intraepiteliais de baixo grau e na identificação de casos com uma tendência de progressão para lesões de alto grau, contribuindo assim para a melhoria da qualidade dos programas de rastreamento das lesões precursoras do câncer cervical.

- No presente estudo verificou-se que a expressão de p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7 foi significativamente associada à progressão das lesões intraepiteliais cervicais, indicando que a utilização dos biomarcadores relacionados acima pode ser útil em identificar e distinguir as lesões intraepiteliais de baixo grau e de alto grau.
- Nas amostras cervicais estudadas, a expressão das proteínas p16<sup>INK4a</sup> e MCM7, foi significativamente associada à presença do DNA do HPV, sugerindo que a análise da imunorreatividade dos biomarcadores, no contexto da infecção pelo HPV, pode ser considerada uma importante ferramenta na identificação de casos com uma alta tendência de progressão para lesões de alto grau.
- No presente trabalho não foi encontrada uma associação significativa entre a expressão da proteína Ki-67 e a infecção pelo HPV, apoiando a hipótese de que embora Ki-67 possa ser utilizado como um eficiente marcador de proliferação é provável que essa proteína não apresente um papel fundamental no desenvolvimento do câncer cervical.
- Considerando os padrões de topografia e distribuição de células e/ou núcleos positivos para p16<sup>INK4a</sup>, Ki-67 e MCM7, nas amostras estudadas, observou-se uma correlação positiva entre a expressão das proteínas analisadas, indicando que a utilização dos três biomarcadores pode ser eficiente na detecção e na distinção das lesões intraepiteliais cervicais.
- No presente estudo, observou-se que o índice de marcação (LI) de MCM7 foi consistentemente maior do que o LI de Ki-67, nas amostras cervicais analisadas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Adachi Y, Usukura J, Yanagida M. **A globular complex formation by Nda1 and the other five members of the MCM protein family in fission yeast.** *Genes Cells.* 1997 Jul;2(7):467-79.
- Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. **p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types.** *Mod Pathol.* 2003 Jul; 16(7):665-73.
- Allan BR, Marais DJ, Denny L, Hoffman M, Shapiro S, Williamson AL. **The agreement between cervical abnormalities identified by cytology and detection of high-risk types of human papillomavirus.** *South African Medical Journal,* 96(11):1186-90, 2006.
- Anderson SM. **Human Papillomavirus and Cervical Cancer.** *Clinical Microbiology Newsletter* 2002; 24, (15): 113-118.
- Andersson S, Wangsa D, Flores-Staino C, Safari H, Mints M, Hjerpe A, Hagmar B, Johansson B. **Expression of p16<sup>INK4a</sup> in relation to histopathology and viral load of 'high-risk' HPV types in cervical neoplastic lesions.** *Eur J Cancer* 2006; 42(16):2815-2820.
- Aparicio OM, Weinstein DM, Bell SP. **Components and dynamics of DNA replication complexes in S- cerevisiae: Redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase.** *Cell* 1997;91:59–69.
- Apgar BS, Zoschnick L, Wright TC. **The 2001 Bethesda System terminology.** *Am Fam Physician.* 2003; 68(10):1992-8.
- Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM. **Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer.** *J Clin Microbiol.* 2006; 44(5):1755-62.
- Arora R, Kumar A, Prusty BK, Kailash U, Batra S, Das BC. **Prevalence of high-risk human papillomavirus (HR-HPV) types 16 and 18 in healthy women with cytologically negative Pap smear.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005; 121(1):104-9.
- Bahnassy AA, Zekri AR, Alam El-Din HM, Aboubakr AA, Kamel K, El-Sabah MT, Mokhtar NM. **The role of cyclins and cyclins inhibitors in the multistep process of HPV-associated cervical carcinoma.** *J Egypt Natl Canc Inst.* 2006;18(4):292-302.
- Bahnassy AA, Zekri AR, Saleh M, Lotayef M, Moneir M, Shawki O. **The possible role of cell cycle regulators in multistep process of HPV-associated cervical carcinoma.** *BMC Clin Pathol.* 2007 May 24;7:4.

Bell SP. **Eukaryotic replicators and associated protein complexes.** *Curr Opin Genet Dev.* 1995 Apr;5(2):162-7.

Bell SP, Dutta A. **DNA Replication In Eukaryotic Cells.** *Annu. Rev. Biochem.* 2002. 71:333-74.

Benevolo M, Mottolese M, Marandino F, Vocaturo G, Sindico R, Piperno G, Mariani L, Sperduti I, Canalini P, Donnorso RP, Vocaturo A. **Immunohistochemical expression of p16(INK4a) is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions.** *Mod Pathol.* 2006;19(3):384-91.

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

Blow JJ, Hodgson B. **Replication licensing - defining the proliferative state?** *Trends Cell Biol.* 2002;12:72-78.

Blow JJ, Dutta A. **Preventing re-replication of chromosomal DNA.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 June; 6(6): 476-486.

Bodén E, Evander M, Wadell G, Bjersing L, von Schoultz B, Rylander E. **Detection of human papilloma virus in women referred for colposcopy. A comparison between different diagnostic methods.** *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 69(2):153-9, 1990.

Bosch FX, Muñoz N. **The viral etiology of cervical cancer.** *Virus Res.* 2002; 89(2):183-90.

Bosch FX, de Sanjosé S. **Human papillomavirus in cervical cancer.** *Curr Oncol Rep.* 2002; 4(2):175-83.

Brake T, Connor JP, Petereit DG, Lambert PF. **Comparative analysis of cervical cancer in women and in a human papillomavirus-transgenic mouse model: identification of minichromosome maintenance protein 7 as an informative biomarker for human cervical cancer.** *Cancer Res.* 2003;63:8173-80.

Branca M, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Giorgi C, Benedetto A, Paba P, Favalli C, Costa S, Agarossi A, Alderisio M, Syrjänen K. **p16(INK4A) expression is related to grade of cin and high-risk human papillomavirus but does not predict virus clearance after conization or disease outcome.** *Int J Gynecol Pathol.* 2004;23(4):354-65.

Brewster AS, Wang GW, Yu X, Greenleaf WB, Carazo JM, Tjajadi M, Klein MG, Chen XS. **Crystal structure of a near-full-length archaeal MCM: functional insights for an AAA+ hexameric helicase.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008. USA 105: 20191-20196.

Brown DC, Gatter KC. **Monoclonal antibody Ki67: its use in histopathology.** *Histopathology.* 1990; 17; 489-503.

- Brown DC, Gatter KC. **Ki67 protein: the immaculate deception?** *Histopathology*. 2002;40(1):2-11.
- Bubán T, Tóth L, Tanyi M, Kappelmayer J, Antal-Szalmás P. **Ki-67 - new faces of an old player.** *Orv Hetil*. 2009;150(23):1059-70.
- Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T. **Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells.** *J Cell Physiol*. 2006;206(3):624-35.
- Bulten J, van der Avoort IA, Melchers WJ, Massuger LF, Grefte JM, Hanselaar AG, de Wilde PC. **p14ARF and p16INK4A, two products of the same gene, are differently expressed in cervical intraepithelial neoplasia.** *Gynecol Oncol*. 2006;101(3):487-94.
- Burger JC, Shibata T, Kleihues P. **The use of the monoclonal antibody Ki67 in the identification of proliferating cells.** *Am. J. Surg. Pathol*. 1986; 10; 611–617.
- Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K. **Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity.** *Public Health Genomics*. 2009;12(5-6):281-90. Epub 2009 Aug 11.
- Carta G, Di Stefano L, Catellani Perelli A, Toro G, Moscarini M. **Colposcopy, cytology and histology in the diagnosis of squamous intraepithelial lesions of the cervix.** *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, 26(2):60-6, 1999.
- Chacón J, Sanz I, Rubio MD, de la Morena ML, Díaz E, Mateos ML, Baquero F. **Detection and genotyping of high-risk human papillomavirus in cervical specimens.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25(5):311-6, Mai, 2007.
- Chatrath P, Scott IS, Morris LS et al. **Aberrant expression of minichromosome maintenance protein-2 and Ki67 in laryngeal squamous epithelial lesions.** *Br. J. Cancer* 2003; 89; 1048–1054.
- Chesnokov I, Remus D, Botchan M. **Functional analysis of mutant and wild-type Drosophila origin recognition complex.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Oct 9;98(21):11997-2002. Epub 2001 Oct 2.
- Cheung JL, Lo KW, Cheung TH, Tang JW, Chan PK. **Viral load, E2 gene disruption status, and lineage of human papillomavirus type 16 infection in cervical neoplasia.** *J Infect Dis*. 2006; 194(12):1706-12. Epub 2006 Nov 3.
- Choo KB, Lee HH, Pan CC, Wu SM, Liew LN, Cheung WF, Han SH. **Sequence duplication and internal deletion in the integrated human papillomavirus type 16 genome cloned from a cervical carcinoma.** *J Virol*. 1988 May;62(5):1659-66.



Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa LL. Chapter 3: **HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases.** *Vaccine*. 2006; Suppl 3:S26-34. Epub 2006 Jun 2.

Clyne RK, Kelly TJ. **Genetic analysis of an ARS element from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.** *EMBO J*. 1995 Dec 15;14(24):6348-57.

Dalstein V, Riethmuller D, Prétet JL, Le Bail Carval K, Sautière JL, Carbillet JP, Kantelip B, Schaal JP, Mouglin C. **Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study.** *Int J Cancer*. 2003 Sep 1;106(3):396-403.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. **Classification of papillomaviruses.** *Virology*. 2004; 324(1):17-27.

Dhar SK, Delmolino L, Dutta A. **Architecture of the human origin recognition complex.** *J. Biol. Chem*. 2001;276:29067–29071.

Diffley JF. **Once and only once upon a time: specifying and regulating origins of DNA replication in eukaryotic cells.** *Genes and Development* 1996;10: 2819–2830.

Doorbar J. **The papillomavirus life cycle.** *J Clin Virol*. 2005; 32 Suppl 1:S7-15.

Doorbar J. **Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer.** *Clin Sci (Lond)*. 2006;110(5):525-41.

Dray M, Russell P, Dalrymple C, Wallman N, Angus G, Leong A, Carter J, Cheerla B. **P16(INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. I: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies.** *Pathology*. 2005 Apr;37(2):112-24.

Dresang LT. **Colposcopy: an evidence-based update.** *The Journal of the American Board of Family Practice / American Board of Family Practice*, 18(5):383-92, 2005.

Dudderidge TJ, Stoeber K, Loddo M, et al. **Mcm2, Geminin, and KI67 define proliferative state and are prognostic markers in renal cell carcinoma.** *Clin Cancer Res*. 2005, 11: 2510-2517.

Dudderidge TJ, McCracken SR, Loddo M, et al. **Mitogenic growth signalling, DNA replication licensing, and survival are linked in prostate cancer.** *Br J Cancer*. 2007;96: 1384-1393.

Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonnuyom S, Gonzalez S, Crum CP, Munger K. **The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(18):10002-7.

Duensing S, Duensing A, Crum CP, Münger K. **Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype.** *Cancer Res.* 2001; 61(6):2356-60.

Dutta A, Bell SP. **Initiation of DNA replication in eukaryotic cells.** *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997;13:293-332.

Eleutério Junior J, Giraldo PC, Cavalcante DI, Gonçalves AK, Eleutério RM. **Association between high risk HPV viral load, p16ink4a expression and intra-epithelial cervical lesions.** *Rev Assoc Med Bras.* 2007;53(6):530-4.

Endl E, Gerdes J. **The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function.** *Exp Cell Res.* 2000;257(2):231-7.

Esposito V, Baldi A, Liuzzi G, Tonini G, Vincenzi B, Persichetti P, Santini M, Ambrogi V, Mineo TC, Montesarchio V, Wolner E, Baldi F, Groeger AM. **Analysis of Fas (Apo-1/CD95) expression in non-small cell lung cancer.** *Anticancer Res.* 2003 Nov-Dec;23(6C):4901-5.

Fallani MG, Penna C, Fambrini M, Marchionni M. **Cervical cytologic reports of ASCUS and LSIL. Cyto-histological correlation and implication for management.** *Minerva ginecologica*, 54(3):263-9, 2002.

Feger G. **Identification and complete cDNA sequence of the missing Drosophila MCMs: Dm MCM3, Dm MCM6 and Dm MCM7.** *Gene*, 1999, v. 227, 149-155.

Fehrmann F, Klumpp DJ, Laimins LA. **Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation.** *J Virol.* 2003; 77(5):2819-31.

Feng CJ, Li HJ, Li JN, Lu YJ, Liao GQ. **Expression of MCM7 and CDC6 in oral squamous cell carcinoma and pre-cancerous lesions.** *Anticancer Res.* 2008; 28: 3763–9.

Fernandez PC, Frank SR, Wang L, Schroeder M, Liu S, Greene J, Cocito A, Amati B. **Genomic targets of the human c-Myc protein.** *Genes Dev.* 2003 May 1;17(9):1115-29. Epub 2003 Apr 14.

Fletcher RJ, Bishop BE, Leon RP, Sclafani RA, Ogata CM, Chen XS. **The structure and function of MCM from archaeal M. Thermoauto-trophicum.** *Nature Structural Biology* 2003;10:160–167.

Freeman A, Morris LS, Mills AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH & Coleman N. **Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy.** *Clin. Cancer Res.* 1999. 5, 2121–2132.

Fujioka S, Shomori K, Nishihara K, et al. **Expression of minichromosome maintenance 7 (MCM7) in small lung adenocarcinomas (pT1): prognostic implication.** *Lung Cancer* 2009; 65: 223–9.

Fujita MTKYH, Ishibashi M. **hCDC47, a human member of MCM family.** *J. Biol. Chem.* 1996. v. 271, p. 4349-4354.

Gambichler T, Shtern M, Rotterdam S, Bechara FG, Stücker M, Altmeyer P, Kreuter A. **Minichromosome maintenance proteins are useful adjuncts to differentiate between benign and malignant melanocytic skin lesions.** *J Am Acad Dermatol*, 2009, vol. 05, p. 808-813.

Genther SM, Sterling S, Duensing S, Münger K, Sattler C, Lambert PF. **Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle.** *J Virol.* 2003; 77(5):2832-42.

Gillespie PJ, Li A, Blow JJ. **Reconstitution of licensed replication origins on Xenopus sperm nuclei using purified proteins.** *BMC Biochem.* 2001;2:15.

Ghiorzo P, Villaggio B, Sementa AR, Hansson J, Platz A, Nicoló G, Spina B, Canepa M, Palmer JM, Hayward NK, Bianchi-Scarrà G. **Expression and localization of mutant p16 proteins in melanocytic lesions from familial melanoma patients.** *Hum Pathol.* 2004 Jan;35(1):25-33.

Gompel C, Koss LG. **Citologia Ginecológica e suas bases anatomoclínicas,** Editora Manole Ltda., Primeira Edição, 1997.

Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM. **PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time.** *Am J Clin Pathol.* 1991; 95(2):117-24.

Grm HS, Bergant M, Banks L. **Human papillomavirus infection, cancer & therapy.** *Indian J Med Res.* 2009 Sep;130(3):277-85.

Gross C, Basten D, Langner C. **Squamous cell carcinoma developing from epidermodysplasia verruciformis.** *Pathology.* 1999; 20(2):120-4.

Guimarães MC, Gonçalves MA, Soares CP, Bettini JS, Duarte RA, Soares EG. **Immunohistochemical expression of p16INK4a and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions.** *J Histochem Cytochem.* 2005 Apr;53(4):509-16.

Gupta R, Srinivasan R, Nijhawan R, Suri V, Uppal R. **Protein p 16INK4A expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix.** *Indian J Pathol Microbiol.* 2010;53(1):7-11.

Halbe, H. W. **Tratado de Ginecologia.** 2.ed. São Paulo: Roca, 1998. v.1-2, 2115p.

Hall PA, Levison DA. **Review: assessment of cell proliferation in histological material.** *J Clin Pathol* 1990;43:184–92.

Hiraiwa A, Fujita M, Nagasaka T, Adachi A, Ohashi M, Ishibashi M. **Immunolocalization of hCDC47 protein in normal and neoplastic human tissues and its relation to growth.** *Int J Cancer.* 1997 Apr 22;74(2):180-4.

Honeycutt KA, Chen Z, Koster MI, Miers M, Nuchtern J, Hicks J, et al. **Deregulated minichromosomal maintenance protein MCM7 contributes to oncogene driven tumorigenesis.** *Oncogene.* 2006;25:4027–32.

Howley PM, Fields BN, Knipe P. **Papillomavirinae and Their Replication.** *Virology* 1996; 58:1625-1650.

Hu B, Burkhart R, Schulte D, Musahl C, Knippers R. **The P1 family: a new class of nuclear mammalian proteins related to the yeast MCM replication proteins.** *Nucleic Acids Res.* 1993, v. 21, p. 5289-5293.

Hu L, Guo M, He Z, Thornton J, McDaniel LS, Hughson MD. **Human papillomavirus genotyping and p16INK4a expression in cervical intraepithelial neoplasia of adolescents.** *Mod Pathol.* 2005; 18(2):267-73.

Huang H-Y, Huang W-W, Lin C-N, Eng H-L, Li S-H, Li C-F, Lu D, Yu S-C, Hsiung C-Y. **Immunohistochemical Expression of p16INK4A, Ki-67, and Mcm2 Proteins in Gastrointestinal Stromal Tumors: Prognostic Implications and Correlations with Risk Stratification of NIH Consensus Criteria.** *Annals of Surgical Oncology.* 2006, 13(12):1633–1644.

Hubbard, R. A. **Human Papillomavirus testing methods.** *Archives of Pathology and Laboratory Medicine.* 2003; 127: 940-945.

IARC. Working Group on the Evaluation of Cancer—Preventive Strategies. **Cervix Cancer Screening.** Lyon: IARC Press. *IARC Handbooks of Cancer Prevention*, 2005, Vol. 10.

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

Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M., and Nevins, J. R. **Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis.** *Mol. Cell. Biol.*, 2001, 21: 4684–4699.

Ishikawa M, Fujii T, Saito M, Nindl I, Ono A, Kubushiro K, Tsukazaki K, Mukai M, Nozawa S. **Overexpression of p16 INK4a as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia.** *Int J Gynecol Cancer.* 2006; 16(1):347-53.

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

Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H-J, Kimura H, Yamada K, Song S-Y. **Enhanced expression of Mcm proteins in cancer cells derived from uterine cervix.** *Eur. J. Biochem.* 2003, 270, 1089–1101.

Jastreboff AM, Cymet T. **Role of the human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy.** *Postgrad Med J.* 2002; 78(918):225-8.

Jo H, Kim JW. **Implications of HPV infection in uterine cervical cancer.** *Cancer Therapy.* 2005; 3:419-434.

Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, Cooper K. **p16INK4A immunoexpression and HPV in situ hybridization signal patterns: potential markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia.** *Am J Surg Pathol.* 2005;29(5):674-9.

Kalof AN, Cooper K. **p16INK4a immunoexpression: surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia.** *Adv Anat Pathol.* 2006;13(4):190-4.

Kawaguchi K, Oda Y, Saito T, Yamamoto H, Tamiya S, Takahira T, Miyajima K, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. **Mechanisms of inactivation of the p16INK4a gene in leiomyosarcoma of soft tissue: decreased p16 expression correlates with promoter methylation and poor prognosis.** *J Pathol.* 2003 Nov;201(3):487-95.

Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, Duensing S, Sheets EE, Munger K, Crum CP. **Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia.** *Am J Surg Pathol.* 2001;25(7):884-91.

Kelly TJ, Brown GW. **Regulation of chromosome replication.** *Annu Rev Biochem.* 2000;69:829-80.

- Kim YT, Zhao M. **Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma.** *Yonsei Med J.* 2005;46(5):597-613.
- Kim NR, Lin Z, Kim KR, Cho HY, Kim I. **Epstein-Barr virus and p16INK4A methylation in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the cervix uteri.** *J Korean Med Sci.* 2005;20(4):636-42.
- Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D 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.
- Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, Kurman RJ, Schmidt D, Stoler M, von Knebel Doeberitz M. **p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia.** *Am J Surg Pathol.* 2002; Nov; 26(11):1389-99.
- Koss LG. **Human papillomavirus testing as a screening tool for cervical cancer.** *JAMA.* 2000; May; 17;283(19):2525-6.
- Kruse AJ, Baak JP, de Bruin PC, Jiwa M, Snijders WP, Boodt PJ, Fons G, Houben PW, The HS. **Ki-67 immunoquantitation in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a sensitive marker for grading.** *J Pathol.* 2001 Jan;193(1):48-54.
- Kruse AJ, Baak JP, de Bruin PC, van de Goot FR, Kurten N. **Relationship between the presence of oncogenic HPV DNA assessed by polymerase chain reaction and Ki-67 immunoquantitative features in cervical intraepithelial neoplasia.** *J Pathol.* 2001 Dec;195(5):557-62.
- Kurman RJ, Malkasian GD, Sedlis A, Solomon D. **From Papanicolaou to Bethesda: the rationale for a new cervical cytologic classification.** *Obstet Gynecol.* 1991; 77(5):779-82.
- Labib K, Tercero JA, Diffley JFX. **Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression.** *Science.* 2000; 288:1643–1647.
- Laitinen S, Martikainen PM, Tolonen T, Isola J, Tammela TL, Visakorpi T. **EZH2, Ki-67 and MCM7 are prognostic markers in prostatectomy treated patients.** *Int J Cancer.* 2008;122:595–602.
- Lee JK, Hurwitz J. **Processive DNA helicase activity of the minichromosome maintenance proteins 4, 6 and 7 comple requires forked DNA structures.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001. USA 98:54–59.

Lee NW, Kim D, Park JT, Kim A. **Is the human papillomavirus test in combination with the Papanicolaou test useful for management of patients with diagnoses of atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesions?** *Arch Pathol Lab Med.* 2001; Nov;125(11):1453-7.

Lesnikova I, Lidang M, Hamilton-Dutoit S, Koch J. **p16 as a diagnostic marker of cervical neoplasia: a tissue microarray study of 796 archival specimens.** *Diagn Pathol.* 2009;4:22.

Li SS, Xue WC, Khoo US, Ngan HYS, Chan KYK, Tam IYS, et al. **Replicative MCM7 protein as a proliferation marker in endometrial carcinoma: a tissue microarray and clinicopathological analysis.** *Histopathology* 2005;46:307–13.

Lin Z, Gao M, Zhang X, Kim YS, Lee ES, Kim HK, Kim I. **The hypermethylation and protein expression of p16 INK4A and DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase in various uterine cervical lesions.** *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005;131(6):364-70.

Longatto Filho A, Utgawa ML, Shirata NK, Pereira SM, Namiyama GM, Kanamura CT, Santos Gda C, de Oliveira MA, Wakamatsu A, Nonogaki S, Roteli-Martins C, di Loreto C, Mattosinho de Castro Ferraz Mda G, Maeda MY, Alves VA, Syrjänen K. **Immunocytochemical expression of p16INK4A and Ki-67 in cytologically negative and equivocal pap smears positive for oncogenic human papillomavirus.** *Int J Gynecol Pathol.* 2005;24(2):118-24.

Longworth MS, Laimins LA. **Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004 Jun;68(2):362-72.

Lorenzato M, Caudroy S, Bronner C, Evrard G, Simon M, Durlach A, Birembaut P, Clavel C. **Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions?** *Hum Pathol.* 2005;36(10):1101-7.

Lörincz AT. **Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening.** *The Journal of Obstetrics and Gynecology Research.* 1996; 22(6):629-36.

MacCallum DE, Hall PA. **The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle.** *J. Pathol.* 2000; 190; 537–544.

Maiorano D, Moreau J, Mechali M. **XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*.** *Nature.* 2000;404:622–625.

Manickam A, Sivanandham M, Tourkova IL. **Immunological role of dendritic cells in cervical cancer.** *Adv Exp Med Biol.* 2007;601:155-62.

Manos MM. *et al.* **The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses.** *Cancer Cell*. New York, 7: 209-214, 1989.

Masumoto N, Fujii T, Ishikawa M, Saito M, Iwata T, Fukuchi T, Susumu N, Mukai M, Kubushiro K, Tsukazaki K, Nozawa S. **P16 overexpression and human papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix.** *Hum Pathol*. 2003; 34(8):778-83.

Matthews K, Leong CM, Baxter L, Inglis E, Yun K, Bäckström BT, Doorbar J, Hibma M. **Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin.** *J Virol*. 2003 Aug;77(15):8378-85.

McGarry TJ, Kirschner MW. **Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis.** *Cell* 1998;93:1043–1053.

Meng MV, Grossfeld GD, Willams GH *et al.* **Minichromosome maintenance protein 2 expression in prostate: characterization and association with outcome after therapy for cancer.** *Clin. Cancer Res*. 2001; 7; 2712–2718.

Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J. **Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers.** *J Virol*. 2003 Oct;77(19):10186-201.

Milde-Langosch K, Riethdorf S, Kraus-Pöppinghaus A, Riethdorf L, Löning T. **Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16MTS1, p21WAF1, and p27KIP1 in HPV-positive and HPV-negative cervical adenocarcinomas.** *Virchows Arch*. 2001 Jul;439(1):55-61.

MINISTÉRIO DA SAÚDE / INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, Viva Mulher. Programa Nacional de Controle do Câncer do colo de útero – Manual informativo, Rio de Janeiro, 1996.

Missaoui N, Trabelsi A, Hmissa S, Fontanière B, Yacoubi MT, Mokni M, Korbi S, Frappart L. **p16(INK4A) overexpression in precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix in Tunisian women.** *Pathol Res Pract*. 2010.

Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. **Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections.** *Journal of Clinical Virology*. 2005;32: 43-51.

Monteiro DL, Trajano AJ, da Silva KS, Russomano FB. **Pre-invasive cervical disease and uterine cervical cancer in Brazilian adolescents: prevalence and related factors.** *Cadernos de saúde pública*, 22(12):2539-48, 2006.



Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. **The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis.** *Kobe J Med Sci.* 2004; 50(1-2):9-19.

Mount SL, Evans MF, Wong C, Cooper K. **Human Papillomavirus-Induced Lesions of cervix. A review and update on the grading of cervical dysplasia.** *Pathology Case Review.* 2003; 8(4):145-151.

Mukherjee G, Muralidhar B, Bafna UD, Laskey RA, Coleman N. **MCM immunocytochemistry as a first line cervical screening test in developing countries: a prospective cohort study in a regional cancer centre in India.** *British Journal of Cancer.* 2007. 96, 1107 – 1111.

Münger K. **The role of human papillomaviruses in human cancers.** *Front Biosci.* 2002; 7:d641-9.

Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F, Turner M, McGuinness E, Griffin M, Martin C, Sheils O, O'Leary JJ. **p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears.** *J Clin Pathol.* 2003;56(1):56-63.

Murphy N, Ring M, Heffron CC, King B, Killalea AG, Hughes C, Martin CM, McGuinness E, Sheils O, O'Leary JJ. **p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer.** *J Clin Pathol.* 2005; 58(5):525-34.

Nakao Y, Yang X, Yokoyama M, Ferenczy A, Tang SC, Pater MM, Pater A. **Induction of p16 during immortalization by HPV 16 and 18 and not during malignant transformation.** *Br J Cancer.* 1997;75(10):1410-6.

Nam EJ, Kim JW, Kim SW, Kim YT, Kim JH, Yoon BS, Cho NH, Kim S. **The expressions of the Rb pathway in cervical intraepithelial neoplasia; predictive and prognostic significance.** *Gynecol Oncol.* 2007;104(1):207-11.

Nam EJ, Kim JW, Hong JW, Jang HS, Lee SY, Jang SY, Lee DW, Kim SW, Kim JH, Kim YT, Kim S, Kim JW. **Expression of the p16 and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection.** *J Gynecol Oncol.* 2008; 19(3):162-168.

Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV. **AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with assembly, operation and disassembly of proteins complexes.** *Genome Res.* 1999. 9:27–43.

Nieh S, Chen SF, Chu TY, Lai HC, Lin YS, Fu E, Gau CH. **Is p16(INK4A) expression more useful than human papillomavirus test to determine the outcome of atypical squamous cells of undetermined significance-categorized Pap smear? A comparative analysis using abnormal cervical smears with follow-up biopsies.** *Gynecol Oncol.* 2005;97(1):35-40.

Nishihara K, Shomori K, Fujioka S, Tokuyasu N, Inaba A, Osaki M, et al. **Minichromosomemaintenance protein 7 in colorectal cancer: implication of prognostic significance.** *Int J Oncol* 2008;33:245–52.

Oehlmann M, Score AJ, Blow JJ. **The role of Cdc6 in ensuring complete genome licensing and S phase checkpoint activation.** *J. Cell Biol.* 2004;165:181–190.190.

Omori M, Hashi A, Nakazawa K, Yuminamochi T, Yamane T, Hirata S, Katoh R, Hoshi K. **Estimation of prognoses for cervical intraepithelial neoplasia 2 by p16INK4a immunoexpression and high-risk HPV in situ hybridization signal types.** *Am J Clin Pathol.* 2007;128(2):208-17.

Ozaki S, Zen Y, Inoue M. **Biomarker expression in cervical intraepithelial neoplasia: potential progression predictive factors for low-grade lesions.** *Hum Pathol.* 2011 Jul;42(7):1007-12. Epub 2011 Feb 11.

Padmanabhan V, Callas P, Philips G, Trainer TD, Beatty BG. **DNA replication regulation protein Mcm7 as a marker of proliferation in prostate cancer.** *J Clin Pathol.* 2004;57:1057–62.

Parry D, Bates S, Mann DJ, Peters G. **Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product.** *EMBO J.* 1995; 14(3):503-11.

Patel S, Chiplunkar S. **Host immune responses to cervical cancer.** *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2009 Feb;21(1):54-9.

Paulo M, Borges AB, Duarte G, Quintana SM, Montes MB, Toloí MR. **The environmental cofactors in carcinogenesis in high risk HPV/HIV-positive women.** *The Brazilian Journal of Infectious Diseases,* 11(2):189-95, 2007.

Pereyra E. A. G, Guerra D. M. M., Villa, L. L. **Papilomavirose humanas. In: Tratado de Infectologia.** Editora Atheneu, São Paulo, p. 457-463, 1996.

Peyton CL. **Comparison of PCR- and hybrid capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies.** *Journal of Clinical Microbiology.* 1998; 36(11):3248-54.

Pinto AP, Guedes GB, Tuon FF, Maia HF, Collaço LM. **Cervical cancer screening program of Paraná: cytohistological correlation results after five years.** *Diagnostic Cytopathology,* 33(4):279-83, 2005.

Poljak M, Seme K, Gale N. **Rapid extraction of DNA from archival clinical specimens: our experiences.** *Pflugers Arch.* 2000;439(3 Suppl):R42-4.

Prokhorova TA, Blow JJ. **Sequential MCM/P1 subcomplex assembly is required to form a heterohexamer with replication licensing activity.** *J. Biol. Chem* 2000;275:2491–2498.

Queiroz C, Silva TC, Alves VA, Villa LL, Costa MC, Travassos AG, Filho JB, Studart E, Cheto T, de Freitas LA. **P16(INK4a) expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions.** *Pathol Res Pract.* 2006; 202(2):77-83.

Queiroz C, Silva TC, Alves VA, Villa LL, Costa MC, Travassos AG, Filho JB, Studart E, Cheto T, de Freitas LA. **Comparative study of the expression of cellular cycle proteins in cervical intraepithelial lesions.** *Pathol Res Pract.* 2006; 202(10):731-7.

Quinn CM, Wright NA. **The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables.** *J. Pathol.* 1990; 160; 93–102.

Rahmanzadeh R, Hüttmann G, Gerdes J, Scholzen T. **Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis.** *Cell Prolif.* 2007;40(3):422-30.

Ren B, Yu G, Tseng GC, Cieply K, Gavel T, Nelson J, et al. **MCM7 amplification and overexpression are associated with prostate cancer progression.** *Oncogene.* 2006;25:1090–8.

Remus D, Beuron F, Tolun G, Griffith JD, Morris EP, Diffley JFX. **Concerted loading of MCM2-7 double hexamers around DNA during DNA replication Origin Licensing.** *Cell,* 2009, V.139 (4), p. 719-730.

Reuschenbach M, Seiz M, Doeberitz CV, Vinokurova S, Duwe A, Ridder R, Sartor H, Kommos F, Schmidt D, Doeberitz MV. **Evaluation of cervical cone biopsies for coexpression of p16(INK4a) and Ki-67 in epithelial cells.** *Int J Cancer.* 2011 Mar 8. doi: 10.1002/ijc.26017.

Roberts S, Ashmole I, Rookes SM, Gallimore PH. **Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1–E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments.** *J Virol.* 1997; 71(5):3554-62.

Romanowski P, Madine MA. **Mechanisms restricting DNA replication to once per cell cycle: the role of Cdc6 and ORC.** *Trend Cell Biol.* 1997; 7; 9–10.

Rosai J. **Uterus-cervix.** Em Rosai (ed.): Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, ed. 9. Philadelphia, 2004, MOSBY, p. 1523-1568.

Rowles A, Chong JP, Brown L, Howell M, Evan GI, Blow JJ. **Interaction between the origin recognition complex and the replication licensing system in *Xenopus*.** *Cell*. 1996 Oct 18;87(2):287-96.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. **Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.** *Science*, 1985, 230(4732): 1350 – 1354.

Sakaguchi M, Fujii Y, Hirabayashi H, Yoon HE, Komoto Y, Oue T, Kusafuka T, Okada A, Matsuda H. **Inversely correlated expression of p16 and Rb protein in non-small cell lung cancers: an immunohistochemical study.** *Int J Cancer*. 1996; 65(4):442-5.

Salcedo Mde M, Silveira GP, Zettler CG. **Immunohistochemical expression of p16 and herpes simplex virus type 2 in squamous intraepithelial lesions and cervical cancer.** *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008;30(2):61-6.

Samama B, Lipsker D, Boehm N. **p16 expression in relation to human papillomavirus in anogenital lesions.** *Hum Pathol*. 2006; 37(5):513-9.

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. **Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels.** *Biotechniques*. 1994; 17(5):914-21.

Sano T, Masuda N, Oyama T, Nakajima T. **Overexpression of p16 and p14ARF is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and dysplasia.** *Pathol Int*. 2002;52(5-6):375-83.

Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JC, Ferenczy A, Rohan TE, Villa LL, Franco EL. **Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia.** *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95(17):1336-43.

Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J. **The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins.** *J Cell Biol*. 1993 Nov;123(3):513-22.

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

Scott M, Nakagawa M, Moscicki AB. **Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection.** *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001 Mar;8(2):209-20.

Schwacha A, Bell SP. **Interactions between two catalytically distinct MCM subgroups are essential for coordinated ATP hydrolysis and DNA replication.** *Mol. Cell*. 2001;8:1093–1104.

Sellors JW, Sankaranarayanan R. **Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Beginners' Manual.** Washington, D.C.: OPAS, 2004.

Serrano M. **The tumor suppressor protein p16INK4a.** *Exp Cell Res.* 1997; 25;237(1):7-13.  
Shechter D, Ying CY, Gautier J. **DNA unwinding is an Mcm complex-dependent and ATP hydrolysis dependent process.** *J Biol Chem.* 2004;279:45586-93.

Silva AMTC, Amaral MVT, Cruz AD. HPV e Câncer: o papel do papiloma vírus humano na carcinogênese. *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento* 2002, 29: 48-54.

Shimizu H, Burns J C. **Extraction of Nucleic Acids: Sample Preparation from Paraffin-Embedded Tissues.** In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. PCR Estrategies. San Diego, CA, Academic Press, Inc., 1995, p 32-38.

Shohet JM, Hicks MJ, Plon SE, et al. **Minichromosome maintenance protein MCM7 is a direct target of the MYCN transcription factor in neuroblastoma.** *Cancer Res.* 2002, 62: 1123-1128.

Shroyer KR, Homer P, Heinz D, Singh M. **Validation of a Novel Immunocytochemical Assay for Topoisomerase II-a and Minichromosome Maintenance Protein 2 Expression in Cervical Cytology.** *Cancer Cytopathology.* 2006 / Volume 108 / Number 5; p. 324-30.

Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. **The 2001 Bethesda System - terminology for reporting results of cervical cytology.** *Journal of the American Medical Association,* 2002; 87:2114-2119.

Song SH, Park HM, Eom DW, Lee JK, Lee NW, Kim AR, Hur JY, Lee KW, Park YK, Saw HS. **The expression of p16 (INK4a) and Ki-67 in relation to high-risk human papilloma viral load and residual disease after conization with positive margins.** *Int J Gynecol Cancer.* 2007;17(4):858-67.

Spitzer M, Apgar BS, Brotzman GL. **Management of Histologic Abnormalities of The Cervix.** *American Academy of Family,* 73:105-12, 2006.

Srivastava S. **P16INK4A and MIB-1: an immunohistochemical expression in preneoplasia and neoplasia of the cervix.** *Indian J Pathol Microbiol.* 2010 Jul-Sep;53(3):518-24.

Stoeber K, Halsall I, Freeman A, Swinn R, Doble A, Morris L, Coleman N, Bullock N, Laskey RA, Hales CN, Williams GH. **Immuno-assay for urothelial cancers that detects DNA replication protein Mcm5 in urine.** *Lancet .* 1999, 354, p.1524-1525.

Stubenrauch F, Laimins LA. **Human papillomavirus life cycle: active and latent phases.** *Semin Cancer Biol.* 1999 Dec;9(6):379-86.

Suzuki, S., Adachi, A., Hiraiwa, A., Ohashi, M., Ishibashi, M., and Kiyono, T. **Cloning and characterization of human MCM7 promoter.** *Gene (Amst.).* 1998, 216: 85–91.

Tachibana KE, Gonzalez MA, Coleman N. **Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology.** *J Pathol.* 2005;205: 123–9.

Tada S, Li A, Maiorano D, Mechali M, Blow JJ. **Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin.** *Nat. Cell Biol* 2001;3:107–113.

Tafari CP. **Patologia ginecológica e obstétrica: complicações clínicas.** Rio de Janeiro: editora MEDSI, 1989. 246p.

Tamura T, Shomori K, Haruki T, Nosaka K, Hamamoto Y, Shiomi T, Ryoke K, Ito H. **Minichromosome maintenance-7 and geminin are reliable prognostic markers in patients with oral squamous cell carcinoma: immunohistochemical study.** *Oral Pathol Med.* 2010, 39: 328–334.

Tan GC, Norlatiffah S, Sharifah NA, Razmin G, Shiran MS, Hatta AZ, Paul-Ng HO. **Immunohistochemical study of p16 INK4A and survivin expressions in cervical squamous neoplasm.** *Indian J Pathol Microbiol.* 2010;53(1):1-6.

Tanaka H, Tanaka K, Murakami H, Okayama H. **Fission yeast cdc24 is a replication factor C- and proliferating cell nuclear antigen-interacting factor essential for S-phase completion.** *Mol Cell Biol.* 1999 Feb;19(2):1038-48.

Taylor ER, Dornan ES, Boner W, Connolly JA, McNair S, Kannouche P, Lehmann AR, Morgan IM. **The fidelity of HPV16 E1/E2-mediated DNA replication.** *J Biol Chem.* 2003;278(52):52223-30.

Termini L, Villa LL. **Biomarcadores na Triagem do Câncer do Colo Uterino.** *J bras Doenças Sex Transm.* 2008; 20(2): 12-131.

Thomison J 3rd, Thomas LK, Shroyer KR. **Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma.** *Hum Pathol.* 2008;39(2):154-66.

Todorov, I.T., Werness, B.A., Wang, H.-Q., Buddharaju, L.N., Todorova, P.D., Slocum, H.K., Brooks, J.S. & Huberman, J.A. **HsMCM2/BM28: a novel proliferation marker for human tumors and normal tissues.** *Laboratory Invest.* 1998. 78, 73–78.

Torres-Rendon A, Roy S, Craig GT, Speight PM. **Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas.** *British Journal of Cancer*. 2009, 100, 1128 – 1134.

Tsai HY, Hsi BL, Hung IJ, Yang CP, Lin JN, Chen JC, Tsai SF, Huang SF. **Correlation of MYCN amplification with MCM7 protein expression in neuroblastomas: a chromogenic in situ hybridization study in paraffin sections.** *Hum Pathol*. 2004 Nov;35(11):1397-403.

Tsai HT, Wu CH, Lai HL, Li RN, Tung YC, Chuang HY, Wu TN, Lin LJ, Ho CK, Liu HW, Wu MT. **Association between quantitative high-risk human papillomavirus DNA load and cervical intraepithelial neoplasm risk.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Nov;14(11 Pt 1):2544-9.

Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Malamou-Mitsi V, Paraskevaidis E. **p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis.** *Cancer Treat Rev*. 2009;35(3):210-20.

Tye BK. **MCM proteins in DNA replication.** *Annu. Rev. Biochem*. 1999; 68; 649–686.

Tyring SK. **Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response.** *J Am Acad Dermatol*. 2000; 43(1 Pt 2):S18-26.

Ungureanu C, Socolov D, Anton G, Mihailovici MS, Teleanu S. **Immunocytochemical expression of p16INK4a and HPV L1 capsid proteins as predictive markers of the cervical lesions progression risk.** *Rom J Morphol Embryol*. 2010;51(3):497-503.

Van Niekerk D, Guillaud M, Matisic J, Benedet JL, Freeberg JA, Follen M, MacAulay C. **p16 and MIB1 improve the sensitivity and specificity of the diagnosis of high grade squamous intraepithelial lesions: methodological issues in a report of 447 biopsies with consensus diagnosis and HPV HCII testing.** *Gynecol Oncol*. 2007 Oct;107(1 Suppl 1):S233-40. Epub 2007 Sep 7.

Villa LL. **Human papillomaviruses and cervical cancer.** *Adv Cancer Res*. 1997;71:321-41.

Villa LL, Pinheiro NA. **Low Frequency of p53 Mutation in Cervical Carcinomas Among Brazilian Women.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2001; 34:27-33.

Volgareva G, Zavalishina L, Andreeva Y, Frank G, Krutikova E, Golovina D, Bliev A, Spitkovsky D, Ermilova V, Kissel'ov F. **Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells.** *BMC Cancer*. 2004;4:58.

von Knebel Doeberitz M. **New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections.** *Eur J Cancer.* 2002;38(17):2229-42.

Waga S, Stillman B. **The DNA replication fork in eukaryotic cells.** *Annu Rev Biochem.* 1998;67:721-51.

Walts AE, Bose S. **p16, Ki-67, and BD ProExC immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia.** *Hum Pathol.* 2009;40(7):957-64.

Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angström T, Lindström MS, Wallin KL. **Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer.** *Clin Cancer Res.* 2004;10(7):2407-14.

Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, Hildesheim A, Bratti MC, Wright T, Rodriguez AC, Chen S, Reichert A, von Knebel Doeberitz C, Ridder R, von Knebel Doeberitz M. **Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(8):1355-60.

Wharton SB, Maltby E, Jellinek DA, et al. **Subtypes of oligodendroglioma defined by 1p, 19q deletions, differ in the proportion of apoptotic cells but not in replication-licensed non-proliferating cells.** *Acta Neuropathol (Berl)* 2007, 113: 119-127.

Williams GH, Romanowski P, Morris L, Madine M, Mills AD, Stoeber K, Marr J, Laskey RA, Coleman N. **Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication.** *Proc.Natl Acad. Sci.* 1998. USA 95, 14932–14937.

Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. **Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features.** *Virus Genes.* 2002 Jun;24(3):275-90.

Wohlschlegel JA, Dwyer BT, Dhar SK, Cvetic C, Walter JC, Dutta A. **Inhibition of eukaryotic replication by geminin binding to Cdt1.** *Science* 2000;290:2309–2312.

Wright DK, Manos MM. **Sample Preparation from Paraffin-Embedded Tissues.** In: INNIS et al. (eds.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.** San Diego, CA, Academic Press, Inc., 1990, p 153-158.

Yamaguchi A, Hashimoto N, Tsutae W, Seino K, Ebina Y, Tokino T, Sato N, Kikuchi K. **Detection of human papillomavirus DNA by PCR/microfluorometry for screening of cervical cancer.** *Clin Chim Acta.* 2002; 318(1-2):41-9.



Yamamoto LS, Alves VA, Maeda MY, Longatto-Filho A, Utagawa ML, Eluf Neto J. **A Morphological Protocol and Guide-list on Uterine Cervix Cytology Associated to Papillomavirus Infection.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004; 46(4):189-93.

Yildiz IZ, Usubütün A, Firat P, Ayhan A, Küçükali T. **Efficiency of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the p16 literature.** *Pathol Res Pract.* 2007;203(6):445-9.

Yoshida T, Fukuda T, Sano T, Kanuma T, Owada N, Nakajima T. Yoshida T, Fukuda T, Sano T, Kanuma T, Owada N, Nakajima T. **Usefulness of liquid-based cytology specimens for the immunocytochemical study of p16 expression and human papillomavirus testing: a comparative study using simultaneously sampled histology materials.** *Cancer.* 2004;102(2):100-8.

You Z, Masai H. **Cdt1 Forms a Complex with the Minichromosome Maintenance Protein (MCM) and Activates Its Helicase Activity.** *Journal of Biological Chemistry* 2008. Vol. 283, N. 36, pp. 24469–24477.

Zeng WJ, Li Y, Fei HL, Cheng XD, Ye F, Lü WG, Xie X. **The value of p16ink4a expression by fluorescence in situ hybridization in triage for high risk HPV positive in cervical cancer screening.** *Gynecol Oncol.* 2011 Jan;120(1):84-8. Epub 2010 Oct 8.

Zhang Q, Kuhn L, Denny LA, De Souza M, Taylor S, Wright TC Jr. **Impact of utilizing p16INK4A immunohistochemistry on estimated performance of three cervical cancer screening tests.** *Int J Cancer.* 2007;120(2):351-6.

Zheng ZM, Baker CC. **Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation.** *Front Biosci.* 2006; 11:2286-302.

Zou L, Stillman B. **Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase.** *Mol Cell Biol.* 2000 May;20(9):3086-96.

zur Hausen H. **Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas.** *Curr Top Microbiol Immunol.* 1977;78:1-30.

zur Hausen H. **Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes.** *Semin Cancer Biol.* 1999 Dec;9(6):405-11.

zur Hausen H. **Papillomaviruses Causing Cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis.** *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92(9):690-8.

zur Hausen H. **Papillomaviruses and Cancer: from basic studies to clinical application.** *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(5):342-50.

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

zur Hausen H. **Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account.** *Virology.* 2009; 384(2):260-5.

# **ANEXO 1**

## **Parecer do COEP**

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

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

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

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

Autores: Annamaria Ravara Vago; Soraya Lobato Charmon

Unidade: Departamento de Morfologia ICB/UFMG

Documentos apresentados:

Carta de encaminhamento do projeto ao COEP

Protocolo de pesquisa

Folha de rosto

Parecer substanciado – Departamento de Morfologia ICB/UFMG

Curriculum vitae – plataforma lattes

Orçamento financeiro - FAPEMIG

Referências Bibliografias

TCLE

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

Início da pesquisa: agosto de 2009

Término da pesquisa: agosto de 2013

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

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

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

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

Belo Horizonte, 25 de Novembro de 2009.

À Prof<sup>a</sup> Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP – Comitê de Ética em Pesquisa – UFMG  
Ao Prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior  
Sub-coordenador do COEP – Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG

Prezados Professores,

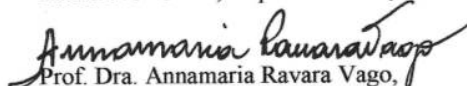
Vimos apresentar ao COEP – Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, o Projeto de Pesquisa intitulado “EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS REGULADORAS DO CICLO CELULAR EM LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E SUA CORRELAÇÃO COM OS TIPOS DE HPVs (Virus do Papiloma Humano) DE ALTO RISCO”, a ser desenvolvido sob a Coordenação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

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

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

Colocando-nos à disposição para os esclarecimentos necessários,

Subscrevemo-nos, respeitosamente,

  
Prof. Dra. Annamaria Ravara Vago,

Departamento de Morfologia,

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

email: [arvago@icb.ufmg.br](mailto:arvago@icb.ufmg.br)

Raquel Álvares da Silva Campos

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

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

Secretaria Municipal de Saúde

Prefeitura de Belo Horizonte (PBH)

email: [urssf@pbh.gov.br](mailto:urssf@pbh.gov.br)

## **ANEXO 2**

### **Condições da PCR e Programas de Amplificação**

## ANEXO 2 – Condições da PCR e Programas de Amplificação.

### Condições da PCR para amplificação do gene da $\beta$ -globina humano.

| Constituintes      | [ ] total      | [ ] por tubo | Volume por tubo |
|--------------------|----------------|--------------|-----------------|
| Iniciador PC03     | 16 pm/ $\mu$ l | 5 pm         | 0,5 $\mu$ l     |
| Iniciador PC04     | 10 pm/ $\mu$ l | 5 pm         | 0,5 $\mu$ l     |
| dNTP's             | 2,5 mM         | 200 $\mu$ M  | 0,8 $\mu$ l     |
| Tampão PHT         | 10X            | 1x           | 1,0 $\mu$ l     |
| Taq (Phoneutria)   | 5 UI/ $\mu$ l  | 1UI          | 0,2 $\mu$ l     |
| ddH <sub>2</sub> O | -              | -            | 6,0 $\mu$ l     |

Volume final de 10 microlitros: 9  $\mu$ l de Mix e 1  $\mu$ l de DNA da amostra.

### Programa utilizado na amplificação do gene da $\beta$ -globina humano.

| Passo | Temperatura         | Tempo      |
|-------|---------------------|------------|
| 01    | 95 °C               | 4 minutos  |
| 02    | 55 °C               | 1 minuto   |
| 03    | 72 °C               | 2 minutos  |
| 04    | 95 °C               | 1 minuto   |
| 05    | 29 vezes ao passo 2 |            |
| 06    | 55 °C               | 1 minuto   |
| 07    | 72 °C               | 10 minutos |
| 08    | 4 °C                | 10 minutos |
| 09    | FIM                 |            |

### Condições da PCR para amplificação de um fragmento de DNA viral de 150 pb.

| Constituintes                   | [ ] total       | [ ] por tubo | Volume por tubo |
|---------------------------------|-----------------|--------------|-----------------|
| GP5 (Alpha DNA)                 | 10pmol/ $\mu$ L | 10pmol       | 1,0 $\mu$ L     |
| GP6+ (Alpha DNA)                | 10pmol/ $\mu$ L | 10pmol       | 1,0 $\mu$ L     |
| dNTP's (Invitrogen)             | 2,5mM           | 200 $\mu$ M  | 0,8 $\mu$ L     |
| Tampão (Phoneutria)             | 10X             | 1X           | 1,0 $\mu$ L     |
| Taq DNA polimerase (Phoneutria) | 5UI/ $\mu$ L    | 1UI          | 0,2 $\mu$ L     |
| ddH <sub>2</sub> O              | -               | -            | 5,0 $\mu$ L     |

Volume final de 10 microlitros : 9  $\mu$ L de Mix e 1  $\mu$ L de DNA da amostra.

**Programa utilizado na amplificação do fragmento de DNA viral de 150 pb.**

| Passo | Temperatura              | Tempo      |
|-------|--------------------------|------------|
| 01    | 95°C                     | 4 minutos  |
| 02    | 95°C                     | 1 minuto   |
| 03    | 45°C                     | 1 minuto   |
| 04    | 72°C                     | 1 minuto   |
| 05    | 39 vezes ao passo de 2 a |            |
| 06    | 72°C                     | 1 minuto   |
| 07    | 4°C                      | 10 minutos |
| 08    | FIM                      |            |

**Iniciadores utilizados na reação de Hemi - Nested - PCR para tipagem dos HPVs 16 e 18.**

| Primer             | Alvo  | Sequência de Nucleotídeos                  | HPV amplificado | Tamanho do produto |
|--------------------|-------|--|-----------------|--------------------|
| E7CR3 (antissenso) | E6/E7 | (reverso: 5'- TGA GCT GTC GCT TAA TTG CTC) | Variável        | Variável           |
| 16SF1 (senso)      | E6/E7 | (5'- TGT ATG TCT TGT TGC AGA TCA TCA)      | HPV16           | 149                |
| 18SF2(senso)       | E6/E7 | (5'- CCA TTC GTG CTG CAA CCG)              | HPV18           | 177                |

Fonte: Yamaguchi *et al.* (2002)

**Condições da PCR para amplificação dos fragmentos de DNA dos HPVs 16 e 18.**

| Constituintes                         | [ ] Total        | [ ] por tubo | Vol. por tubo |
|---------------------------------------|------------------|--------------|---------------|
| Iniciador E7CR3 (Alpha DNA)           | 10 pmol/ $\mu$ L | 10 pmol      | 1,00 $\mu$ L  |
| Iniciador tipo específico (Alpha DNA) | 10 pmol/ $\mu$ L | 10 pmol      | 1,00 $\mu$ L  |
| dNTPs (Invitrogen)                    | 2,5 mM           | 200 $\mu$ M  | 0,80 $\mu$ L  |
| Tampão (Phoneutria)                   | 10 X             | 1 X          | 1,00 $\mu$ L  |
| Taq DNA polimerase (Phoneutria)       | 5 UI/ $\mu$ L    | 1 UI         | 0,20 $\mu$ L  |
| ddH <sub>2</sub> O                    | -                | -            | 5,00 $\mu$ L  |

Volume final de 10 microlitros: 9  $\mu$ L de Mix e 1  $\mu$ L de DNA da amostra.



**Programa utilizado na amplificação dos fragmentos de DNA dos HPV's 16 e 18.**

| Passo | Temperatura              | Tempo      |
|-------|--------------------------|------------|
| 01    | 95°C                     | 5 minutos  |
| 02    | HPV16: 54°C, HPV18: 52°C | 1 minuto   |
| 03    | 72°C                     | 1 minuto   |
| 04    | 95°C                     | 1 minuto   |
| 05    | 39 X ao passo de 2 a 4   |            |
| 06    | HPV16: 54°C, HPV18: 52°C | 1 minuto   |
| 07    | 72°C                     | 10 minutos |
| 08    | 4°C                      | 10 minutos |
| 09    | FIM                      |            |

## **ANEXO 3**

### **Protocolo de Coloração pela Prata**

### **ANEXO 3 – Protocolo de Coloração pela Prata**

Após a eletroforese, os géis foram submersos em solução fixadora (contendo 5 mL de ácido acético-VETEC, 100 mL de etanol e ddH<sub>2</sub>O até um volume final de 1000 mL), por no mínimo 10 minutos. Em seguida, os géis foram expostos à solução de coloração contendo 0,30g de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) (Labsynth), 100 mL de solução fixadora e 200 mL água, por 15 minutos. Os géis, então, foram lavados com água destilada por 30 segundos e revelados com solução reveladora contendo 30g de hidróxido de sódio (NaOH) (VETEC), 10 mL de formaldeído (Cromoline) e ddH<sub>2</sub>O para o volume final de 1000 mL, até o aparecimento das bandas de interesse (SANGUINETTI *et al.*, 1994).

## **ANEXO 4**

**Artigo aceito à publicação na revista científica**  
***Journal of Gynecologic Oncology***

**Decision Letter (JGO-11-0089.R2)**

**From:** hsryu@ajou.ac.kr

**To:** arvago@icb.ufmg.br

**CC:**

**Subject:** Journal of Gynecologic Oncology - Decision on Manuscript ID JGO-11-0089.R2

**Body:** @@date to be populated upon sending@@

Dear Dr. Vago:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Minichromosome Maintenance 7 Protein is a reliable biological marker for human cervical progressive disease" in its current form for publication in the Journal of Gynecologic Oncology. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Journal of Gynecologic Oncology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,  
Dr. Hee-Sug Ryu  
Editor-in-Chief, Journal of Gynecologic Oncology  
hsryu@ajou.ac.kr

Reviewer(s)' Comments to Author:

Reviewer: 1

Comments to the Author

Thank you for your effort to revise the manuscript. I hope you get more achievement.

**Date Sent:** 31-Jul-2011

## **Minichromosome Maintenance 7 Protein is a reliable biological marker for human cervical progressive disease.**

Soraya Lobato,<sup>1</sup> Alexandre Tafuri,<sup>1</sup> Paula Ávila Fernandes,<sup>3</sup> Marcelo Vidigal Caliari,<sup>2</sup> Marcos Xavier Silva,<sup>4</sup> Marcelo Antônio Pascoal Xavier,<sup>5</sup> and Annamaria Ravara Vago<sup>1\*</sup>.

1 – Department of Morphology and 2-Department of Pathology, Institute of Biological Sciences; 3 – Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy, 4 – Department of Preventive Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; 5 Department of Medical Sciences, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil.

\* Corresponding author

**Grant Support:** This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) and from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

**Running head:** MCM7, Ki67 and P16 as biomarkers tools for CIN progression

**Send all correspondence to:**

Dr. Annamaria Ravara Vago, PhD, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Zip code: 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil.

Fax Number: 55-31-3499-2771, Email: [arvago@icb.ufmg.br](mailto:arvago@icb.ufmg.br).

## ABSTRACT

**Objective:** This study was focused on comparing the expression levels of p16, Ki67 and Minichromosome maintenance (MCM) 7 proteins in normal and affected cervical epithelium to ascertain the biological significance of these markers in detecting progressive cervical disease.

**Material and Methods:** A quantitative and based on-scanning-microscopy analysis of the three markers expression was performed in normal and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) I, II and III tissues. P16 area as well as p16, Ki67 and MCM 7 positive cells or nuclei were evaluated according to their distribution and extent through the cervical epithelium.

**Results:** A clear p16 over-expression was observed in all the dysplastic epithelium tissue samples. The quantitative analysis of p16 area as well as the number of p16 positive cells was able to better discriminate the CIN lesions grades than the usual semi-quantitative analysis. The average Ki67 labeling indexes (LIs) for the normal epithelium, CIN I, CIN II and CIN III groups were 19.8%, 27.3%, 32.8% and 37.1%, respectively, whereas the mean MCM7 LIs for the correspondent grades were 27.0%, 30.4%, 50.5% and 67.2%. The Ki67 and MCM7 LIs were closely correlated with the CIN histological grade, with higher LI values obtained from the more severe lesions ( $P < 0.05$ ), being the MCM7 LIs the highest values in all the CIN categories ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** It was observed a good correlation among the p16, Ki67 and MCM7 data. In addition, MCM7 demonstrated to be a more efficient and sensitive marker to assess disease progression in the uterine cervix.

**Keywords:** Minichromosome Maintenance (MCM) 7 protein, Ki67, P16<sup>INK4a</sup>, Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) biomarkers, Immuno-fluorescence analysis.

## INTRODUCTION

Screening programs based on cytological staining techniques (Pap test) has led to a remarkable decline in incidence and mortality from invasive cervical cancer. However the Pap test efficacy is hampered by the high inter-observer variability and false negative/positive rates (Tsoumpou *et al.*, 2009). Even the “gold standard” histological assessment of cervical biopsies, can be significantly affected by the intra- and inter-observer inconsistencies. Novel markers potentially applied on cytological/histological specimens could improve the identification of lesions with increased risk for progression. P16<sup>INK4a</sup> (p16) is a tumor suppressor protein typically over-expressed in dysplastic and neoplastic cervix epithelium (review in Tsoumpou *et al.*, 2009). By means of a semi-quantitative analysis, several studies showed that high-grade lesions (CINII to invasive cancer) exhibited a full-thickness and strong p16 immuno-staining (Agoff *et al.*, 2003; review in Kalof and Cooper, 2006; Tsoumpou *et al.*, 2009). However, a quantitative evaluation of p16 positive areas and cells in normal and affected cervical epithelium has not been performed.

The proliferative capacity of tumor cells is a fundamental feature of growing tumors. Ki-67 is a general proliferation marker (Scholzen and Gerdes, 2000) widely used to characterize malignant lesions including those of the cervix. The Ki67 staining into the upper epithelium layers accomplishes the severity of cervical lesions (Keating *et al.*, 2001; Agoff *et al.*, 2003), but the exact nuclear function of Ki67 antigen is largely unknown (Scholzen and Gerdes, 2000). Thus, detecting markers directly involved in DNA replication might be a more precise way to evaluate proliferative behavior in dysplastic and neoplastic processes.



Minichromosome maintenance (MCM) proteins (2-7) complex consists of six subunits with essential function in initiation and elongation of DNA replication (review in Bell and Dutta, 2002). Additionally, it has only been demonstrated in replicating cells (Freeman *et al.*, 1999). MCM7 was reported to be associated with tumor formation, progression and malignant conversion (Brake *et al.*, 2003). It has also been considered a valuable proliferation marker in several cancer types, such as oral, prostatic, colonic (Nishihara *et al.*, 2008), lung-adenocarcinoma and cervical (Brake *et al.*, 2003). Few studies investigated the MCM7 expression in human cervix tissues (Freeman *et al.*, 1999; Brake *et al.*, 2003), and there were no reports that comparatively evaluated the MCM7 expression with those originated from the most commonly used p16 and Ki67 markers. The purpose of this study was to compare the potential of these three nuclear proteins as biomarkers for the cervical disease progression.

## **MATERIAL AND METHODS**

**Tissue samples:** Twenty paraffin-embedded cervical samples (5 normal epithelium, 5 CIN I, 5 CIN II and 5 CIN III cases) were obtained from the archive of a large histopathological diagnostic service laboratory. This study was approved by the National Council of Ethics in Research.

**Indirect Immuno-fluorescence:** Serial sections (5µM-thick) were immersed in xylene, re-hydrated, heated in water-bath for 30 minutes for antigen retrieval, and blocked with 2%PBS/BSA for 60 minutes at room temperature (RT). Sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies: p16 mouse-monoclonal antibody-clone JC8 (1:800, LabVision), Ki67 rabbit-polyclonal antibody-clone H-300, (1:100, Santa Cruz/Biotechnology) and MCM7 mouse-monoclonal antibody, clone DCS-141 (1: 1000, Abcam). Sections were next incubated (1 hour-RT) with secondary antibodies: Cy2–Streptavidin-conjugated anti-

mouse antibody (Molecular-Probes Inc.) and Cy5-conjugated anti-rabbit antibody (Molecular-Probes Inc.), washed, mounted (Hydramount/National Diagnostics) and examined at high-magnification fields (40X) by scanning confocal microscopy (Carl Zeiss LSM/510Meta). Strong nuclear and cytoplasmic labeling was considered a p16 positive-reaction; the Ki67/MCM7 markers' positivity was based on strong nuclear labeling detection. Quantitative determination of p16 immuno-positive areas and the number of positive cells and/or nuclei for all markers was performed by the KS-300/Image Analyzer Carl Zeiss. Spearman's correlation statistical-technique was used for analyzing the association between the biomarker's expression and the cervical-epithelium histological grade. Pearson's correlation statistical-technique was used for comparative-evaluation between p16 positive cells/nuclei and Ki67/MCM7 positive nuclei.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. The quantitative results were also expressed in a semi-quantitative scale, by using previously published scoring-criteria (Agoff *et al.*, 2003). The Ki-67 and MCM7 labeling indexes (LI) were calculated by dividing the number of positive nuclei by the total nuclei number (Nishihara *et al.*, 2008).

## **RESULTS**

Normal tissues did not show any positive areas or immuno-reactive cells for p16 (Table 1). However an increasing of p16 immuno-labeled areas was observed along with the severity of cervical disease (Table 1). A similar result was verified when these values were expressed in a semi-quantitative scale: the majority of CINI, II and III samples exhibited a growing pattern of p16 positive areas (Table 2). In accordance with the quantitative p16 area analysis, it was observed an increase in p16 positive cells according to the CIN severity degree (Table 1). However, when these results were semi-quantitatively expressed the p16 immuno-labeling

analysis within the CIN groups showed greater variability (Table 2). Regarding the Ki67 results, the number of Ki67 positive nuclei increased from normal to CINII epithelium, but no notable differences were observed between CINII and III values (Table 1). Most of normal, CINI and II tissue samples, showed a similar Ki67 labeling pattern (+2 score), whereas the majority of CINIII samples was scored as +3. A growing expression of MCM7 was observed from normal to CINIII samples, with the highest MCM7 expression values detected in CINIII cases (Table 1). Accordingly, most of normal and all the CINI samples were MCM7 scored as +2, while the majority (60%) of CINII and III samples were scored as +3 and +4 (Table 2). The MCM7 labeling indexes (LIs) exhibited a good correlation with the Ki67 LIs ( $P < 0.05$ ), and the MCM7 labeling-index for each case was considerably higher than the corresponding Ki67 LIs. The obtained Ki67 LIs mean values were 19.8 (with samples/values ranging from 15.8 to 22.5) for the normal epithelium, 27.31 (8.4-33.75) for CINI-group, 32.84 (22.0-66.2) for CINII-category and 37.16 (19.25-49.1) for CINIII-group ( $P < 0.05$ ). The average MCM7 LIs values for the corresponding groups were 27.06 (with values ranging from 15.1 to 37.6)-normal epithelium, 30.36 (20.2-36.5)-CINI, 50.54 (37.7-70.4)-CINII and 67.26 (39.0-100.0)-CINIII; ( $P < 0.05$ ). According to the biomarkers' expression distribution through the cervical epithelium, all the normal cervical tissue samples were negative for p16 and showed Ki67 and MCM7 labeling in the lower (1/3) basal epithelium (Figure 1). Forty percent of CINI samples exhibited p16 immuno-expression in the basal layer, while 100% of CINII and III samples showed labeling of 2/3 and 3/3 of the epithelium. Concerning the Ki-67 expression topology, 60% of CINI and 100% of CINII samples showed 2/3 of the epithelium staining while 60% of CINIII exhibited labeling in 3/3 of the epithelium. Most of normal and CINI tissue samples expressed MCM7 in the 1/3 basal-epithelium, whereas the majority of CINII and III cases showed MCM labeling in 2/3 of the epithelium.

## DISCUSSION

In this study we have shown, using a quantitative-evaluation approach, that p16, Ki67 and MCM7 markers are significantly correlated with cervical lesions progression. Several studies confirmed negative to minimal p16-staining in normal/reactive cervical biopsies, with considerable variability in the CIN grade samples presenting strong p16 immuno-reactivity (Kalof and Cooper, 2006; Tsoumpou *et al.*, 2009). Therefore, quantitative analysis of p16 areas and/or cells seemed to be a better approach when performing the categorization of CIN groups than conventional semi-quantitative evaluation. Additionally, we performed a comparative analysis between Ki67 and MCM7 proliferation-related proteins as CIN progression markers.

Ki67 positivity extending 2/3 of the epithelium was reported to be associated with increasing cervical dysplasia degree (Keating *et al.*, 2001; Agoff *et al.*, 2003). However, this marker specificity is low (Agoff *et al.*, 2003), Ki67 expression-levels can be altered by external factors and there is no evidence that this protein is essential for cell proliferation (Scholzen and Gerdes, 2000). Here, we observed a higher expression of both Ki67 and MCM7 in high-grade when compared to low-grade lesions or normal cervical-epithelium. Few studies have examined MCMs as proliferation markers in cervical disease and have focused mostly in analyzing the MCM2/5 expression. In only one study the MCM7 staining topology-pattern was evaluated in cervical, normal and affected tissues (Brake *et al.*, 2003). Our results are concordant with this report, since a significant association between the p16, Ki67 and MCM7 topology-patterns expression and human-cervical disease progression was observed. Other reports showed that MCM7 labeling-indexes were consistently higher than Ki67 LIs in several cancer types (Nishihara *et al.*, 2008, Brake *et al.*, 2003). Previous studies have shown that, additionally to proliferative cells, MCM proteins were expressed in potent or early-proliferating cells (Bell and

Dutta, 2002). Thus, these observations may imply that, Ki67 does not label all proliferating cells of some tumors (Scholzen and Gerdes 2000).

We believe that MCM7 offers a great advantage over other proliferating biomarkers, since it is not expressed in cells undergoing DNA repair (Bell and Dutta, 2002) and exhibits a higher sensitivity to identify abnormal precursor cells than Ki-67/PCNA (Brake *et al.*, 2003).

Consequently, MCM7 is regarded an excellent candidate marker for cancer screening, surveillance, and prognosis (Freeman *et al.*, 1999; Nishihara *et al.*, 2008). In a prospective study involving the analysis of cervical smear samples from 455 Indian women, the combined use of MCM2/5-staining and Pap-counterstaining disclosed 10 previously missing cases of biopsy-proven cervical cancer or pre-cancer when using the standard Pap-staining (Mukherjee *et al.*, 2007). Although this study was focused on the evaluation of MCM7 as an indicator of progressive-cervical disease in tissue samples, the biomarker expression demonstrated a satisfactory correlation with CIN progression, suggesting that MCM7 could be used as a valuable tool for improving the diagnosis and screening of pre-malignant lesions and cervical cancer.

## REFERENCES

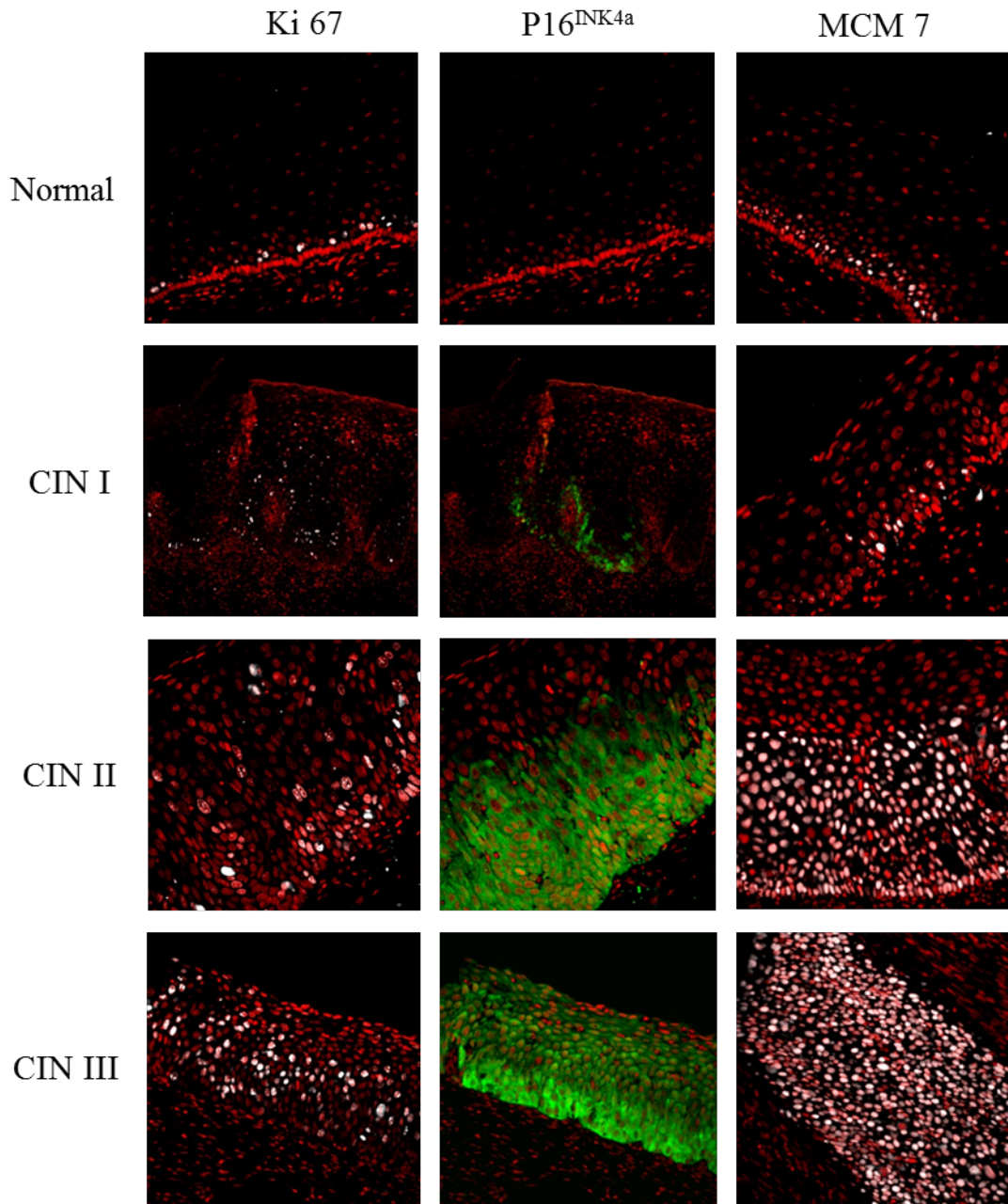
- Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, et al. P16<sup>INK4a</sup> immuno-staining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treatment Reviews* 2009; 35: 210–20.
- Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. P16<sup>INK4a</sup> expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol* 2003; 16: 665–73.
- Kalof AN, Cooper K. P16<sup>INK4a</sup> Immuno-expression: Surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Adv Anat Pathol* 2006; 13: 190-4.
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311–22.
- Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade B, Sun D, et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4a are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001; 25:884–91.
- Bell SP, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 2002; 71: 333–374.
- Freeman A, Morris LS, Mills AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH, et al. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2121–32.

Brake T, Connor JP, Petereit DG, Lambert PF. Comparative analysis of cervical cancer in women and in a human papillomavirus-transgenic mouse model: identification of minichromosome maintenance protein 7 as an informative biomarker for human cervical cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 8173–80.

Nishihara K, Shomori K, Fujioka S, Tokuyasu N, Inaba A, Osaki M, et al. Minichromosome maintenance protein 7 in colorectal cancer: implication of prognostic significance. *Int J Oncol* 2008; 33: 245–52.

Mukherjee G, Muralidhar B, Bafna UD, Laskey RA, Coleman N. MCM immunocytochemistry as a first line cervical screening test in developing countries: a prospective cohort study in a regional cancer centre in India. *British Journal of Cancer* 2007; 96: 1107-11.

**FIGURE 1**



**FIGURE LEGEND: Comparative immuno-fluorescent analysis of Ki67, p16 and MCM7 markers expression in human-cervical tissue-samples obtained by LEEP. The diagnoses were independently reviewed/confirmed by three certified pathologists. Positive Ki-67 and MCM7 cells show fluorescence-labeling confined to the nucleus (white), whereas p16-positive cells show nuclear/and/cytoplasmic labeling (green). Nuclei were immuno-labeled with propidium-iodide (red).**



**TABLE 1: Quantitative mean values of p16 immuno-expression area and the p16, Ki67 and MCM7 positive cells/nuclei versus histological diagnosis §**

|        |                                 |                           | <u>*P16 X MCM7</u>        |                           |
|--------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|        |                                 |                           | <u>*P16 X Ki67</u>        | <u>*Ki67 X MCM7</u>       |
|        | P16 expression area #           | P16 positive cells #      | Ki67 positive nuclei #    | MCM7 positive nuclei #    |
| Normal | 0<br>(8533.26-13736.0)          | 0<br>(194.4-215.17)       | 76.26<br>(45.84-114.45)   | 107.5<br>(60.82-179.12)   |
| CINI   | 6668.25<br>(8533.26-13736.0)    | 122.44<br>(194.4-215.17)  | 178.11<br>(65.47-427.41)  | 279.25<br>(134.49-760.42) |
| CINII  | 67122.46<br>(57333.57-77451.38) | 581.83<br>(445.14-699.52) | 220.02<br>(151.35-360.81) | 328,45<br>(172.53-528.6)  |
| CINIII | 88297.93<br>(74615.94-98388.0)  | 704.51<br>(464.75-903.12) | 207.18<br>(155.0-446.21)  | 546.92<br>(69.48-1026.0)  |

§ P16 immuno-positive areas values were expressed in square micrometers=  $\mu\text{M}^2$ . The ranging values obtained within the each category group are given in parentheses. # Spearman's correlation coefficient-test;  $P < 0.05$ . \* Pearson's correlation coefficient-test;  $P < 0.05$ .

**TABLE 2: Semi-quantitative values of p16 area and the p16, Ki67 and MCM7 cells/nuclei immuno-labeling versus the histological diagnosis §**

|           | P16 expression areas  |      |       |        | P16 positive-cells    |      |       |        |
|-----------|-----------------------|------|-------|--------|-----------------------|------|-------|--------|
| Grading#  | Normal                | CINI | CINII | CINIII | Normal                | CINI | CINII | CINIII |
| 0         | 100                   | 40   | -     | -      | 100                   | 40   | -     | -      |
| +1        | -                     | 60   | -     | -      | -                     | 20   | -     | -      |
| +2        | -                     | -    | 100   | 20     | -                     | 40   | -     | -      |
| +3        | -                     | -    | -     | 80     | -                     | -    | 100   | 100    |
|           | Ki 67 positive-nuclei |      |       |        | MCM 7 positive-nuclei |      |       |        |
| Grading * | Normal                | CINI | CINII | CINIII | Normal                | CINI | CINII | CINIII |
| 0         | -                     | -    | -     | -      | -                     | -    | -     | -      |
| +1        | 40                    | 20   | -     | 20     | 20                    | -    | -     | -      |
| +2        | 60                    | 80   | 80    | 20     | 80                    | 100  | 20    | 20     |
| +3        | -                     | -    | -     | 60     | -                     | -    | 60    | 20     |
| +4        | -                     | -    | 20    | -      | -                     | -    | 20    | 60     |

§ Percentage of samples from each histological diagnosis group exhibiting the considered marker expression. # Samples were classified as 0, +1, +2, +3 according to the absence (0) or presence of 5-25%, 25-75%, and >75% of p16 positive areas and cells (Agoff *et al.*, 2003). \* Samples were scored as 0, +1, +2, +3 and +4 when exhibited none, 1-20%, 20-40%, 40-60% and > 60% of Ki67/MCM7 positive nuclei (Agoff *et al.*, 2003).