

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA
RAP1 EM BLOCOS DE CÉLULAS ESCAMOSAS PROVENIENTES DE
CITOLOGIA CERVICAL EM MEIO LÍQUIDO**

por

Anna Carolina Cançado Figueiredo

Belo Horizonte
Março/2015
DISSERTAÇÃO MBCM-CPqRR A.C.C. FIGUEIREDO 2015

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA
RAP1 EM BLOCOS DE CÉLULAS ESCAMOSAS PROVENIENTES DE
CITOLOGIA CERVICAL EM MEIO LÍQUIDO**

por

Anna Carolina Cançado Figueiredo

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do
Título de Mestre em Ciências na área de
concentração Biologia Celular e Molecular

Orientação: Dra. Jaqueline Germano de Oliveira
Co-orientação: Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier

Belo Horizonte
Março/2015

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

F475c **Figueiredo, Anna Carolina Cançado.**
2015

Caracterização imunocitoquímica da expressão da proteína RAP1 em blocos de células escamosas provenientes de citologia cervical em meio líquido / Anna Carolina Cançado Figueiredo, 2015.

XXI, 120 f: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 128 – 141

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Esfregaço Vaginal/métodos 2. Teste de Papanicolaou/instrumentação 3. Proteínas rap1 de Ligação ao GTP/análise I. Título. II. Oliveira, Jaqueline Germano de (Orientação). III. Xavier, Marcelo Antônio Pascoal (Co-orientação)..

CDD – 22. ed. – 618.15

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA
RAP1 EM BLOCOS DE CÉLULAS ESCAMOSAS PROVENIENTES DE
CITOLOGIA CERVICAL EM MEIO LÍQUIDO**

por

Anna Carolina Cançado Figueiredo

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Dr.(a) Jaqueline Germano de Oliveira (Presidente)

Prof.(a) Dr.(a) Andrea Teixeira de Carvalho

Prof.(a) Dr.(a) Annamaria Ravara Vago

Suplente: Prof.(a) Dr.(a) Rosiane Aparecida da Silva Pereira

Dissertação defendida e aprovada em: 20/03/2015

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”
(Albert Einstein)

Dedico este trabalho a minha mãe e ao meu avô Omar.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo.

À minha mãe, pelo carinho, confiança, dedicação.

Ao meu irmão, pela amizade e apoio.

À minha família, que torceu todos os dias desejando meu sucesso, especialmente minha avó Helena e meus tios, Silvana e Omar Júnior.

À Dra. Jaqueline pela acolhida, paciência, confiança, dedicação, incentivo, aprendizado, orientação, e por ser em parte responsável pela fase de maior amadurecimento da minha vida.

Ao Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier pelo exemplo, aprendizado, inspiração e orientação científica e de vida.

À Dra. Marilene, Dra. Andrezza e Dra. Júnia pela oportunidade e colaboração.

À Dra. Paula Vidigal pela colaboração.

Ao Dr. Paulo César Peregrino Ferreira pelo incentivo e colaboração.

Ao Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva pela colaboração e ensinamentos.

Ao Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira pelo apoio.

Aos pesquisadores do LICM: Soraya, Adriana Bozzi, Bárbara Quinan, Jacqueline Fiuza, Érica, Ester, pela colaboração e convivência agradável.

A todas as pacientes que gentilmente concordaram em participar desta pesquisa. Sem vocês este projeto não seria possível.

As médicas residentes, Dra. Cecília, Dra. Brenda e Dra. Sabrina pela colaboração preciosa e aprendizado.

À Clari por toda ajuda, dedicação e paciência.

À Fernanda Cèsari pela colaboração e apoio.

Aos técnicos do LICM: Luciana, Vinícius, Ana Pacheco e Ricardo, pelo auxílio.

Aos jovens talentos, Camila, Ramon, André, Heloísa, Vitor, Jéssica, Jéssica Peixoto, Cristiano, Mara e Lucas, por toda ajuda e apoio.

À Carolina Bertini por toda ajuda.

À Izabella, Roberta Prado, Emerson, Jorge, Juliana, Yasmin, Stella, Eneida, Luiza, Talita, Guilherme, Dirli, Victor e Lorena, pela amizade, paciência, aprendizado e companheirismo. Vocês contribuíram para que eu me tornasse uma pessoa melhor.

Aos colegas da Pós-Graduação.

AGRADECIMENTOS ÀS INSTITUIÇÕES FINANCEIRAS

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Centro de Pesquisas René Rachou e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade e infraestrutura.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da bolsa de mestrado.

Ao Hospital das Clínicas e ao Instituto Jenny Faria da UFMG.

Ao Departamento de Anatomia Patológica da FM-UFMG.

Ao Laboratório de Patologia Molecular da FM-UFMG.

À plataforma de Sequenciamento PDTIS-CPqRR.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XVI
RESUMO	XX
ABSTRACT	XXI
1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3 REVISÃO DA LITERATURA	26
3.1 Papilomavírus Humano e Câncer Cervical.....	26
3.1.1 História Natural da infecção por HPV	30
3.2 Neoplasia intraepitelial cervical	34
3.3 Atipias de significado indeterminado em células escamosas	38
3.4 Epidemiologia da infecção genital por HPV e neoplasia cervical no Brasil	40
3.5 Prevenção e diagnóstico da neoplasia intraepitelial cervical.....	41
3.5.1 Teste de Papanicolaou	42
3.5.2 Citologia em meio líquido	44
3.6 Limitações/Desafios no diagnóstico do câncer cervical.....	45
3.7 Biomarcadores da displasia epitelial cervical.....	46
3.8 Proteína RAP1 GTPase	50
3.9 Expressão de RAP1 em tumores	52
3.9.1 Proteína Rap1 como biomarcador do câncer cervical	54
4 POPULAÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1 Estratégias de Trabalho	55
4.2 Aspectos éticos	55
4.3 Critérios de seleção das pacientes	56
4.3.1 Critérios de inclusão das pacientes no estudo	57
4.3.2 Critérios de exclusão das pacientes do estudo.....	57
4.4 Coleta e preservação das amostras	57
4.5 Métodos morfológicos.....	58
4.5.1 Cultivo celular	58
4.5.2 Preparação do bloco de células.....	59
4.5.3 Ensaios imunocitoquímicos.....	62
4.5.4 Parâmetros citomorfológicos e imunocitoquímicos	63
4.5.4.1 Variabilidade interobservador	64

4.6 Métodos moleculares	64
4.6.1 Extração de DNA.....	64
4.6.2 Verificação da presença de inibidores da PCR nas amostras cervicais e da integridade do DNA extraído	65
4.6.3 Detecção do DNA do HPV pela <i>nested</i> -PCR.....	66
4.6.4 Genotipagem do HPV por sequenciamento automático.....	67
4.7 Análises estatísticas	68
5 RESULTADOS.....	69
5.1 Seleção das pacientes.....	69
5.2 Teste de Papanicolaou	70
5.3 Adequabilidade da amostra de bloco de células.....	72
5.4 Desempenho do método bloco de células para o diagnóstico	73
5.5 Variabilidade interobservador no diagnóstico dos blocos de células	80
5.6 Expressão das proteínas RAP1, p16 ^{INK4A} e Ki-67.....	85
5.7 Verificação da presença de inibidores da PCR nas amostras cervicais e da integridade do DNA extraído	98
5.8 Detecção e genotipagem do HPV	99
5.9 Relações entre a imunocitoquímica de RAP1 e o DNA do HPV	102
6 DISCUSSÃO	104
7 CONCLUSÕES	110
8 PERSPECTIVAS.....	110
9 ANEXOS	111
9.1 Termo de consentimento livre e esclarecido para coleta prospectiva de citologia em mulheres adultas	111
9.2 Projeto; CAAE – 27320814.4.0000.5149.....	115
9.3 Artigo.....	116
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Árvore filogenética dos tipos de Papilomavírus identificados.....	27
Figura 2	Organização do genoma do HPV.....	28
Figura 3	Principais etapas do ciclo do HPV.....	30
Figura 4	Estrutura do epitélio cervical.....	31
Figura 5	Nomenclatura citológica e histopatológica das lesões precursoras e do câncer do colo do útero.....	35
Figura 6	Histologia e citologia da infecção por HPV e da NIC1/LIEBG.....	36
Figura 7	Histologia e citologia da mucosa ectocervical com NIC3/LIEAG.....	37
Figura 8	Fluxograma de recomendações de condutas para diagnósticos citopatológicos de ASC-US e ASC-H no Brasil.....	39
Figura 9	Expressão aumentada de p16 no câncer cervical.....	48
Figura 10	Funções biológicas e regulação da proteína RAP1 GTPase.....	51
Figura 11	Estratégias de trabalho.....	55
Figura 12	Frasco para coleta de amostras cervicais para citologia em meio líquido..	58
Figura 13	Preparação do bloco de células (<i>cell block</i>) de amostras cervicais.....	60
Figura 14	Confecção de lâminas das amostras cervicais.....	61
Figura 15	Coágulo celular obtido para preparação de bloco de células.....	62
Figura 16	Testes estatísticos utilizados nesse estudo.....	69
Figura 17	Fluxograma de seleção/triagem de pacientes para inclusão nos grupos ASC e Controle desse estudo.....	70
Figura 18	Amostra de bloco de células classificada como satisfatória.....	73
Figura 19	Representação dos principais parâmetros citopatológicos avaliados nos blocos de células.....	74
Figura 20	Representação dos principais parâmetros citopatológicos avaliados nos blocos de células.....	75
Figura 21	Representação dos principais parâmetros citopatológicos avaliados nos blocos de células.....	76
Figura 22	Representação dos principais parâmetros citopatológicos avaliados nos blocos de células.....	77
Figura 23	Curva ROC dos resultados do exame dos blocos de células em relação ao teste de Papanicolaou.....	79
Figura 24	Análise global da concordância de todos os observadores versus o teste de Papanicolaou, em relação ao grupo “ACB”.....	82
Figura 25	Análise global da concordância de todos os observadores versus o teste	

	de Papanicolaou, em relação ao grupo “ASC”.....	84
Figura 26	Imunocoloração de RAP1 em células HeLa.....	86
Figura 27	Imunocoloração de p16 em células HeLa.....	87
Figura 28	Imunocoloração de Ki-67 em células HeLa.....	88
Figura 29	Expressão de RAP1 nos blocos de células cervicais.....	90
Figura 30	Expressão de RAP1 nos blocos de células cervicais.....	91
Figura 31	Curva ROC da imunocitoquímica de RAP1 em relação ao teste de Papanicolaou.....	93
Figura 32	Expressão de p16 nos blocos celulares.....	95
Figura 33	Expressão de Ki-67 nos blocos de células cervicais.....	97
Figura 34	Verificação da presença de inibidores da PCR através da amplificação de β -globina humana pela PCR.....	98
Figura 35	Verificação da presença de DNA do HPV nas amostras cervicais.....	99
Figura 36	Detecção de DNA do HPV em amostras cervicais pela <i>nested-PCR</i>	100
Figura 37	Cromatograma parcial da sequência de DNA obtida do amplicon de 150pb, de uma amostra cervical, gerado pelo sequenciador automático capilar ABI 3130.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados do teste de Papanicolaou das pacientes do estudo.....	71
Tabela 2	Adequabilidade das amostras de blocos celulares.....	72
Tabela 3	Avaliação de parâmetros citopatológicos nas amostras de blocos de células.....	78
Tabela 4	Resultados do exame dos blocos de células e do teste de Papanicolaou (citologia).....	79
Tabela 5	Análise das concordâncias do diagnóstico dos blocos de células dos observadores denominados 1, 2 e 3 versus o teste de Papanicolaou em relação ao grupo “ACB”.....	80
Tabela 6	Análise da concordância do diagnóstico dos blocos de células entre os observadores 1, 2 e 3 em relação ao grupo “ACB”.....	81
Tabela 7	Análise da concordância do diagnóstico dos blocos de células de todos os observadores versus o teste de Papanicolaou em relação ao grupo “ACB”.....	81
Tabela 8	Análise das concordâncias do diagnóstico dos blocos de células dos observadores 1, 2 e 3 versus o teste de Papanicolaou em relação ao grupo “ASC”.....	83
Tabela 9	Análise da concordância do diagnóstico dos blocos de células entre os observadores 1, 2 e 3 em relação ao grupo “ASC”.....	83
Tabela 10	Análise da concordância do diagnóstico dos blocos celulares de todos os observadores versus o teste de Papanicolaou em relação ao grupo “ASC”.....	84
Tabela 11	Parâmetros imuno-citoquímicos de RAP1 em blocos de células dos grupos “ACB” e “ASC”.....	89
Tabela 12	Resultados da imunocitoquímica de RAP1 e do teste de Papanicolaou.....	92
Tabela 13	Parâmetros imuno-citoquímicos de p16 em blocos de células dos grupos “ACB” e “ASC”.....	93
Tabela 14	Parâmetros imuno-citoquímicos de Ki-67 em blocos celulares dos grupos “ACB” e “ASC”.....	96
Tabela 15	Deteção do DNA de HPV nas amostras cervicais.....	99
Tabela 16	Genotipagem de HPV detectado nas amostras cervicais.....	101

Tabela 17	Resultado da análise de regressão logística entre a presença do DNA do HPV e a expressão imunocitoquímica de RAP1 no grupo “ACB”	102
Tabela 18	Resultado da análise de regressão logística entre a presença do DNA do HPV e a expressão imunocitoquímica de RAP1 no grupo “ASC”	102
Tabela 19	Associação entre a presença do DNA do HPV e a expressão imunocitoquímica de RAP1.....	103
Tabela 20	Testes estatísticos para verificação da associação entre a presença do DNA do HPV e a expressão imunocitoquímica de RAP1.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Símbolo de percentagem
<	Símbolo de menor que
>	Símbolo de maior que
°C	Graus centígrados (Celsius)
µL	Microlitros
µM	Micromolar
AgNO ₃	Nitrato de Prata
ASC	Células escamosas atípicas
ASC-H	ASC não podendo excluir LIEAG
ASC-US	<u>A</u> typical <u>S</u> quamous <u>C</u> ells of <u>U</u> ndetermined <u>S</u> ignificance (células escamosas atípicas de significado indeterminado)
CBL	Citologia em meio líquido
CCE	Carcinoma de células escamosas
CDK	Ciclina dependentes de quinases
CI	Intervalo de confiança
COLN	Coloração do núcleo
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
CROMA	Distribuição da cromatina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
E1a E7	Proteínas não estruturais da região precoce (E)
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
FM-UFMG	Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais
FORMA	Forma do núcleo

G	Gramas
x g	Força centrífuga
GAP	<u>G</u> T <u>P</u> ase <u>a</u> ctivating <u>p</u> rotein (proteína ativadora de GTPase)
GDP	Guanosina difosfato
GEF	<u>G</u> uanine nucleotide <u>e</u> xchange <u>f</u> actor (fator de troca de nucleotídeos guanina)
GTP	Guanosina Trifosfato
GTPase	Proteína ativadora da ligação do nucleotídeo guanina
HC-UFMG	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
HE	Hematoxilina e Eosina
HPV	Human papillomavirus (Papilomavírus humano)
HR-HPV	HPV de alto risco para o câncer de colo de útero
HSIL	High grade squamous intraepithelial lesion (lesão intraepitelial escamosa de alto grau)
IARC	International Agency for Research on Câncer (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer)
ICTV	International Committee on the Taxonomy of Viruses (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)
INCA	Instituto Nacional do Cancer
KDa	Kilo Daltons
Ki-67	Proteína nuclear Ki-67
L1 e L2	Proteínas do capsídeo da região tardia (L)
LCR	Long Control Region (Longa Região de Controle)
LIEAG	Lesão Intraepitelial de alto grau
LIEBG	Lesão Intraepitelial de baixo grau

LR-HPV	HPV de baixo risco para o câncer de colo de útero
LSIL	Low-grade squamous intraepithelial lesion (lesão intraepitelial escamosa de baixo grau)
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
M	Molar
MCM2	Fator de replicação do DNA
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MHC I	Complexo Principal de Histocompatibilidade classe I
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NaOH	Hidróxido de sódio
Ng	Nanogramas
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
nm	Nanômetro
OMS	Organização mundial de saúde
OR	Odds Ratio (razão de possibilidades)
ORF	Open Reading Frames (fase aberta de leitura)
p16	Proteína do gene 16
Pb	Pares de base
PCR	Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
PGDFR	Fator-β de crescimento derivado de plaqueta
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomole

pRb	Proteína Retinoblastoma
PV	Papilomavírus
RAP1	Proteína 1 associada a Ras
RAS	Proteína RAS
RCN	Relação núcleo-citoplasma
RNA	Ácido Ribonucléico
Rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
SISCOLO	Sistema de Informações do Câncer do Colo Uterino
SPA-1	Proteína associada à proliferação 1
STR	Tampão
SUS	Sistema Único de Saúde
Taq	Taq DNA polimerase
TBE	Tris-Borato-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TN	Tamanho do núcleo
TOP2A	DNA topoisomerase 2-alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
U	Unidade
USA	United States of America (Estados Unidos da América)
V	Volts
VLP	Viral like particle (partículas semelhantes a vírus)
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

RESUMO

O diagnóstico precoce acurado do câncer cervical, relevante problema de saúde pública no mundo e no Brasil, pela citologia oncótica (Teste de Papanicolaou), é muito prejudicado pela subjetividade e variabilidade dos resultados falsos negativos e falsos positivos do método, particularmente diante de células escamosas atípicas (ASC). Recentes inovações técnicas, como citologia em meio líquido e imunocitoquímica com biomarcadores de proliferação celular, aumentaram a expectativa de melhorias no rastreamento do câncer cervical. No entanto, a aplicabilidade destas inovações nos estágios mais iniciais de atipia e displasias epiteliais permanecem incertas. Assim, considerando resultado prévio do nosso grupo de pesquisa, que identificou a proteína RAP1 como biomarcador diagnóstico da displasia cervical, este trabalho tem como objetivo caracterizar a expressão da proteína RAP1, comparativamente à expressão dos biomarcadores p16 e Ki-67, por imunocitoquímica, em blocos de células escamosas cervicais para possível aplicabilidade na triagem do câncer do colo do útero. Para tal, 34 amostras, 27 pacientes com diagnóstico de alterações celulares benignas (ACB) e 7 pacientes com diagnóstico de ASC foram coletadas na unidade Jenny Faria do Hospital das Clínicas da UFMG. Os resultados indicaram que 85% das amostras de blocos celulares foram satisfatórias para análise morfológica e a técnica reproduziu os principais parâmetros citopatológicos da citologia convencional. Em relação a sua utilização para diagnóstico, o bloco de células apresentou sensibilidade de 38,46%, especificidade de 90,47% e uma variabilidade interobservador com taxa de concordância de aproximadamente 30% para os grupos ACB e ASC. A expressão da proteína RAP1 foi positiva na maioria das amostras do grupo "ACB" (15/27 ou 55,56%) e resultado negativo na maioria das amostras do grupo "ASC" (4/7 ou 57,14%) com sensibilidade de 16,66%, especificidade de 75, %. As reações imunocitoquímicas das proteínas p16 e Ki-67 demonstraram, em ambos os grupos, apresentaram predomínio absoluto ou totalidade de resultados negativos. O DNA de HPV foi detectado em 9 (33,33%) das 27 amostras do grupo ACB e em 4 (57,14%) das 7 amostras do grupo ASC. O HPV-16 foi detectado nas 4 amostras do grupo ASC. Nas amostras do grupo ACB foram detectados os HPV-16, em 5 amostras, HPV-58, em 2 amostras, HPV-45, em 1 amostra e HPV-66 em 1 amostra. Observamos inexistência de relação entre a presença do HPV e a expressão imunocitoquímica de RAP1 em ambos os grupos. Em conclusão, os blocos de células podem complementar o teste de Papanicolaou na triagem do câncer do colo uterino e a expressão da proteína RAP1 está aumentada em células cervicais em ambiente inflamatório, associado ou não à presença de HPV.

ABSTRACT

The accurate early diagnosis of cervical cancer, relevant public health problem worldwide and in Brazil by cytology (Pap test), is hampered by its subjectivity and variability of false positive and false negative results, particularly on atypical squamous cell (ASC). Recent technical innovations, such as based liquid cytology and immunocytochemistry for with cell proliferation biomarkers, increased the expectation cervical cancer screening. However, the applicability of these innovations in early stages of epithelial dysplasia and atypia remains uncertain. Considering previous findings of our research group, which identified the RAP1 protein as a biomarker diagnosis of cervical dysplasia, this study aims to characterize the expression of RAP1 (compared to the expression of p16 and Ki-67 biomarkers) by immunocytochemistry in cell blocks of cervical squamous cells, for possible applicability in screening for cervical cancer. For this purpose, 27 patients with benign cellular changes (ACB) and 7 patients with ASC diagnosis were collected in Hospital das Clínicas from UFMG. The results indicated that 85% of the samples of cell blocks were satisfactory for morphological analysis and also that the cytological technique reproduces the main parameters of the conventional cytology. Regarding its use for diagnosis, the cell block had a sensitivity of 38.46%, specificity of 90.47% and an interobserver variability with concordance rate of approximately 30% for the ACB and ASC groups. The RAP1 expression was positive in most of the samples of the group "ACB" (15/27 or 55.56%) and most negative in the sample group "ASC" (4/7 or 57.14%) with a sensitivity of 16.66% and specificity of 75%. The immunocytochemical reactions for p16 and Ki-67 showed predominance of negative or all negative staining in both groups. HPV DNA was detected in 9 (33.33%) of the 27 samples of the ACB group and in 4 (57.14%) of 7 ASC group samples. HPV-16 was detected in 4 samples ASC group. Samples from the group ACB HPV-16 were detected in 5 samples, HPV-58 in 2 samples, HPV-45, HPV-1 sample, and 66 in one sample. We observed no relationship between the presence of HPV and immunostaining of RAP1 in both groups. In conclusion, cell blocks can be a ancillary tool to the Pap test for cervical cancer in screening and the expression of the RAP1 protein is increased in cervical cells in an inflammatory environment, with or without the presence of HPV.

1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero ou cervical mantém-se como um importante problema de saúde pública em mulheres no mundo e no Brasil, apesar da ampla disponibilidade de métodos para o rastreamento da sua principal lesão precursora, a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) ou do seu principal fator etiológico, o HPV. Em 2014, no Brasil, foram registrados cerca de 15.590 casos novos de câncer do colo do útero, uma estimativa de 15,33 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo do útero é o mais incidente na região Norte (23,57/ 100 mil). Nas regiões Centro-Oeste (22,19/ 100 mil) e Nordeste (18,79/ 100 mil), é o segundo mais frequente. Na região Sudeste (10,15/100 mil), o quarto e, na região Sul (15,87 /100 mil), o quinto mais frequente (INCA, 2014).

No Brasil, a estratégia recomendada pelo Ministério da Saúde para o rastreamento do câncer do colo uterino é o subjetivo teste citopatológico de Papanicolaou, em mulheres de 25 a 64 anos. Desde a introdução deste exame houve uma significativa queda na incidência e na mortalidade por câncer do colo do útero (INCA, 2014). Contudo, o desempenho do teste de Papanicolaou é prejudicado por elevada variabilidade inter e intraobservador e altas taxas de resultados falsos negativos (20-30%) e falsos positivos (50-70%) [Schiffman *et al.*, 2011].

A recente disponibilidade de testes moleculares para detectar a presença do DNA do HPV em amostras cervicais, conhecidos como testes DNA-HPV, aumentou a expectativa de melhorias no rastreamento do câncer cervical. Alguns desses métodos, incluindo a captura híbrida e reação em cadeia da polimerase (PCR) para HPV, comprovaram, após estudos de validação clínica, a melhoria da acurácia para o diagnóstico da lesão precursora tardia do câncer cervical ou lesão intraepitelial cervical de alto grau (LIEAG) [Roelens *et al.*, 2012].

No entanto, a aplicabilidade dos testes moleculares na triagem de ASC-US e ASC-H permanecem incertas, com limitações para distinguir as infecções transitórias pelo HPV e da infecção persistente e, além disso, a PCR apresenta variabilidade de 35 a 90% (Caetano *et al.*, 2006; Schiffman *et al.*, 2011; Roelens *et al.*, 2012).

Pesquisas focadas na identificação e desenvolvimento de biomarcadores para as lesões precursoras do câncer do colo do útero revelaram, dentre outros, a proteína supressora de tumor p16 e a proteína marcadora da proliferação celular Ki-67, como promissores biomarcadores celulares relacionados à ação das oncoproteínas virais precoces E6 e E7. A utilização de métodos imunoenzimáticos para a avaliação da expressão de p16 e Ki-67 tem se mostrado muito valiosa na redução da variabilidade interobservador no diagnóstico das lesões precursoras do câncer cervical, particularmente no diagnóstico de LIEAG (Roelens *et al.*, 2012). Entretanto, o desempenho de p16 e Ki-67 no diagnóstico de ASC-US, ASC-H ou lesão intraepitelial de baixo grau (LIEBG) permanece insuficiente (Kisser & Zechmeister-Koss, 2014). Assim, a busca por biomarcadores celulares associados à desregulação de vias moleculares sensíveis à ação de outras oncoproteínas virais precoces, como E2, torna-se essencial.

Neste cenário, a proteína RAP1, uma pequena GTPase da superfamília RAS, desponta como candidata a biomarcador das lesões escamosas iniciais, associadas à infecção por HPV. RAP1 GTPase (RAP1) funciona como transdutor bioquímico que regula o crescimento, diferenciação, sobrevivência e adesão das células eucariotas e participa da transformação das células epiteliais infectadas pelo HPV, indiretamente, pela disfunção da proteína celular SPA-1 decorrente da oncoproteína viral E2 e pela degradação da proteína E6TP1 decorrente da oncoproteína viral E6 (Singh *et al.*, 2003; Chakrabarti *et al.*, 2004; Farina *et al.*, 2004).

Nosso grupo de pesquisa identificou e caracterizou a proteína celular RAP1 como um biomarcador da neoplasia cervical, com potencial utilização no auxílio ao diagnóstico deste câncer (Pascoal-Xavier, 2008; 2011; Pascoal-Xavier *et al.*, 2015 [em anexo]). Entretanto, a expressão de RAP1 nunca foi caracterizada em amostras cervicais de citologia em meio líquido.

Assim, diante deste cenário, o presente trabalho visa caracterizar a expressão da proteína RAP1, comparativamente à expressão dos biomarcadores p16 e Ki-67, em amostras cervicais classificadas como ASC, provenientes de citologia em meio líquido (CBL), processadas pela técnica de bloco de células (*cell block*), para possível aplicabilidade na triagem do câncer do colo do útero.

Portanto, considerando-se a ineficiência dos biomarcadores já descritos na acurácia diagnóstica de ASC, ASC-H e LIEBG, que tem impacto direto no tratamento e acompanhamento clínicos das pacientes, este estudo, ao caracterizar a proteína RAP1 nas células epiteliais atípicas ou displásicas, provenientes de CBL, verificará a hipótese da imunocitoquímica de RAP1 como um bom teste de triagem para mulheres com ASC.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar o padrão de expressão imunocitoquímica da proteína RAP1 em blocos de células escamosas provenientes de citologia cervical em meio líquido.

2.2 Objetivos Específicos

1 – Descrever e avaliar o método bloco de células em relação ao diagnóstico de ASC feito pelo exame citopatológico convencional;

2 – Analisar a concordância interobservadores em relação ao diagnóstico de ASC do exame dos blocos células;

3 – Comparar o padrão imunocitoquímico de expressão da proteína RAP1 em amostras cervicais processadas em blocos celulares ao padrão das proteínas p16 e Ki-67;

4 – Detectar e genotipar o DNA do HPV em amostras cervicais pela reação em cadeia da polimerase e sequenciamento automático, respectivamente;

5 – Investigar a possível correlação entre a presença do HPV com o padrão de expressão da proteína RAP1 em amostras cervicais processadas em blocos celulares.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Papilomavírus Humano e Câncer Cervical

O câncer cervical é o quarto tipo de câncer mais prevalente entre a população feminina mundial, matando mais de 288 mil mulheres por ano no mundo. Cerca de 90% dos casos e, aproximadamente, 9 em cada 10 mortes, ocorrem em países de baixa ou média renda, sendo as maiores taxas de incidência observadas na Ásia Central e do Sul, África Subsaariana, América Latina e Melanésia (IARC-WHO, 2015). Para o desenvolvimento do câncer cervical e de sua lesão precursora imediata, a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) grau 3 (NIC3), é necessária uma infecção cervical persistente pelo Papilomavírus Humano ou *Human Papillomavirus* (HPV). Vários estudos epidemiológicos demonstraram a presença do HPV em quase 100% dos casos de câncer cervical (zur Hausen, 1996; Walboomers, 1999; Castellsagué *et al.*, 2008). Vale ressaltar que cerca de 15% dos cânceres humanos são causados por vírus sendo que a metade é atribuída à infecção pelo HPV (Parkin *et al.*, 2006).

Os papilomavírus (PV) pertencem a um grupo de vírus encontrados em mais de 20 espécies de mamíferos, além de aves e répteis, sendo o HPV o mais estudado (Doorbar *et al.*, 2005). Historicamente, a associação entre o HPV e o câncer genital iniciou-se na década de 70. Entre 1974 e 1976, pesquisadores divulgaram os primeiros estudos sobre o papel do HPV no desenvolvimento do câncer cervical. Em 1976, Meisels e Fortin publicaram dois trabalhos descrevendo que o aparecimento de coilócitos em esfregaços cervicais indicava a infecção pelo HPV. Os primeiros tipos de HPV foram identificados diretamente de biópsias de câncer cervical entre 1983 e 1984 (zur Hausen, 2002).

De acordo com o International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV), o HPV é membro da família *Papillomaviridae*, e compreendem os gêneros Alpha, Beta, Gama, Delta, entre outros. O gênero Alpha-papillomavirus é clinicamente mais importante, pois compreende os vírus associados às

lesões da mucosa anogenital (Figura 1) [de Villiers *et al.*, 2004; Bernard *et al.*, 2005; Doorbar *et al.*, 2005].

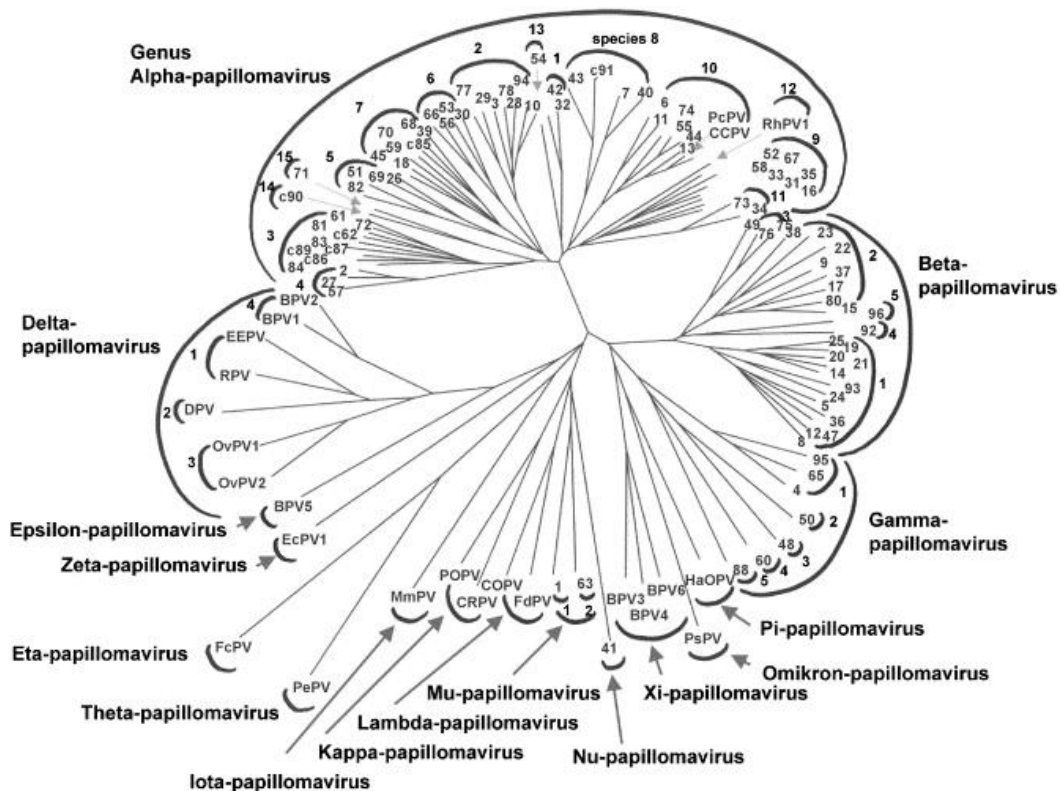


Figura 1 - Árvore filogenética dos tipos de Papilomavírus identificados.
 Fonte: de Villiers *et al.*, 2004

Os HPV são pequenos vírus não envelopados com diâmetro de 52 a 55 nm, possuem genoma de DNA de fita dupla circular com aproximadamente 8000 pares de bases (epissomal) e que infectam o epitélio estratificado escamoso e cutâneo (zur Hausen, 2009). Mais de 100 tipos diferentes de HPV já foram identificados e, aproximadamente um terço deles infectam especificamente as células epiteliais do trato genital. Os outros dois terços restantes infectam células epiteliais em outros tecidos incluindo o epitélio cutâneo (Bernard *et al.*, 2005).

O genoma dos HPV apresentam três regiões principais: a região precoce que codifica as proteínas não estruturais E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (E do inglês *Early*) envolvidas na replicação viral e transformação celular; a região tardia que codifica as proteínas do capsídeo L1 e L2 (do inglês *Late*) e a região controladora não codificadora LCR (do inglês *Long Control Region*) que contém uma variedade de elementos *cis* reguladores da replicação viral e da expressão gênica (Figura 2). O genoma possui 8 fases abertas de leitura ou *open reading*

frames (ORF) ou provenientes de RNA mensageiros policitrônicos transcritos a partir de uma única fita de DNA (Burd, 2003; Longworth & Laimins, 2004; Munger *et al.*, 2004; Scheurer *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2006; Villa, 2006; Doorbar *et al.*, 2007).

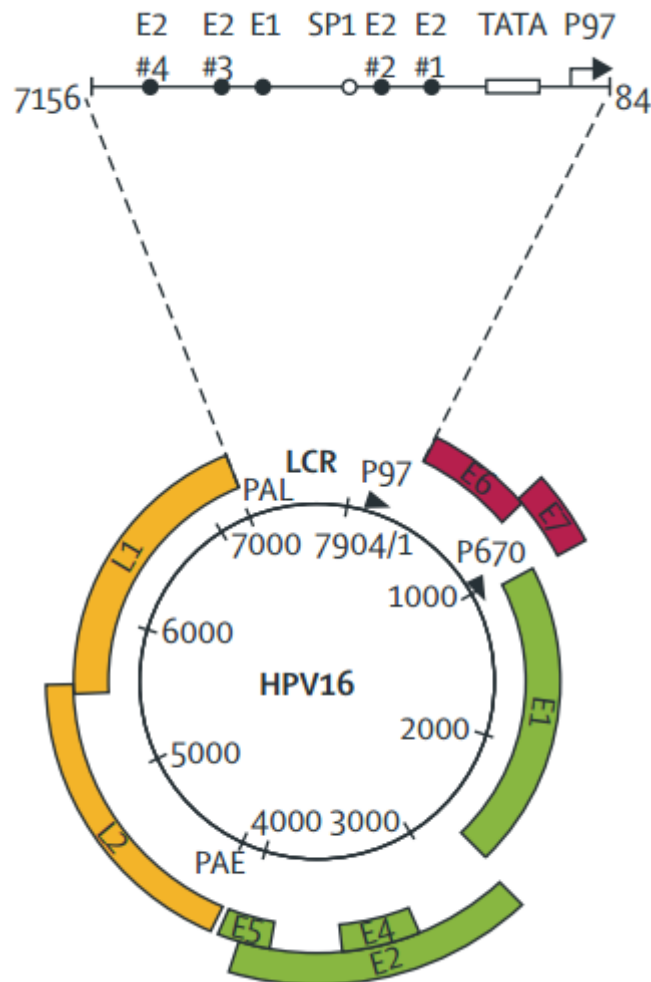


Figura 2 - Organização do genoma do HPV. O genoma do HPV consiste em cerca de 8000 pb de DNA fita dupla circular. A origem de replicação e vários elementos reguladores da transcrição encontram-se na região controladora não codificadora (LCR). O promotor precoce do vírus (P97), o promotor tardio dependente de diferenciação (P670), e os dois sinais de poliadenilação (PAE e PAL) definem os três grupos principais de genes virais que são coordenadamente regulados durante a diferenciação da célula hospedeira. Os genes E6 e E7 mantêm a capacidade de replicação. E1, E2, E4 e E5 estão envolvidas na replicação do DNA do vírus, no controle da transcrição e de outras funções tardias. L1 e L2 são as proteínas do capsídeo. A LCR é ampliada para permitir a visualização dos locais de ligação de E2 e o elemento TATA do promotor p97. A localização do E1 e locais de ligação SP1 também são mostradas. Fonte: Doorbar *et al.*, 2007

A proteína E1, de cerca de 68 KDa, é expressa em baixos níveis nas células infectadas pelo HPV. E1 age na origem de reconhecimento e exibe tanto atividade de ATPase quanto de helicase, separando as fitas do DNA viral. Já a proteína E2, de aproximadamente 50 KDa, é multifuncional, pois participa

da replicação do DNA viral, expressão gênica e segregação do genoma. Na forma de dímero, funciona como ativador ou repressor da transcrição viral, dependendo da sua concentração nuclear (Figura 3) [Moody & Laimins, 2010].

As proteínas precoces virais E6 e E7 expressas nas células basais mantêm a progressão do ciclo celular e retardam a diferenciação terminal epitelial. A proteína E6 interage com a proteína p53 que regula o ciclo celular e a E7 com a proteína retinoblastoma (pRb). Estas interações são fundamentais para o processo de replicação viral, pois induzem a proliferação celular, assim como a eventual imortalização e a transformação maligna das células (Moody & Laimins, 2010). A presença de E6 e E7 promove a característica retenção do núcleo celular em todas as camadas do epitélio infectado (Figura 3) [Doorbar *et al.*, 2006; Bodily & Laimins, 2011].

A replicação do genoma viral inicia-se na camada epitelial proliferativa basal e suprabasal, progride no estrato espinhoso e requer a expressão das proteínas precoces virais E4 e E5. A proteína E4 se associa com ceratinas do citoesqueleto das células epiteliais e induz o colapso da rede de ceratinas. Isto sugere a participação de E4 na liberação da partícula viral. A proteína E5 estimula a multiplicação celular através de interações feitas com os receptores do fator de crescimento epitelial (EGFR), do fator- β de crescimento derivado de plaqueta (PGDFR) e do fator estimulante de formação de colônia, e também bloqueia a expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade classe I (MHC I) na membrana plasmática (Figura 3) [zur Hausen, 2002; Leykauf *et al.*, 2004; Rosseti, Silva, Rodrigues, 2006].

O HPV codifica duas proteínas estruturais, L1 e L2, que são expressas nas camadas superiores do tecido infectado, uma vez que a amplificação do genoma viral tenha sido completada. L1 e L2 são responsáveis pela montagem do capsômero e síntese da partícula viral, nas camadas superiores do epitélio escamoso (Doorbar *et al.*, 2006; Munõz *et al.*, 2006). Posteriormente, as células epiteliais repletas de partículas virais no citoplasma são descamadas para a superfície (Figura 3) [Frazer, 2004].

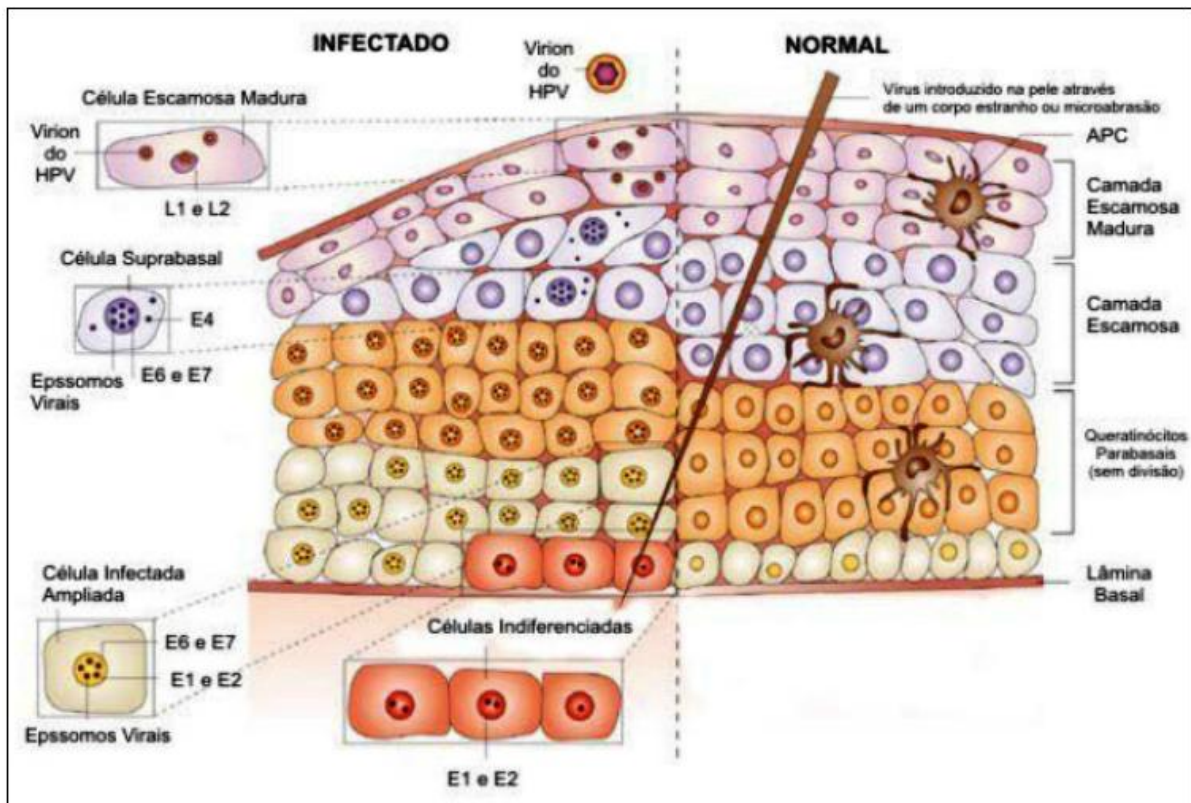


Figura 3 - Principais etapas do ciclo do HPV. Ciclo celular do HPV demonstrando a arquitetura das células escamosas do epitélio cervical e a expressão das proteínas não estruturais do papilomavírus humano (HPV) após a infecção. As células filhas dividem-se ao longo da camada basal e seu processo de maturação é acompanhado da migração em direção à superfície. Nas camadas mais diferenciadas do epitélio, há a síntese das proteínas de replicação, montagem e empacotamento do vírus. As partículas virais acumulam-se no citoplasma das células, assim, estas células, repletas de partículas virais, descamadas para a superfície. Fonte: Adaptado de Frazer, 2004.

3.1.1 História Natural da infecção por HPV

A infecção por HPV requer o acesso da partícula infecciosa às células da camada basal epitelial, através de perda da integridade do epitélio. No caso de infecção cervical, o processo pode ser facilitado pelo acometimento de células colunares da junção epitelial escamo-colunar que podem, subsequentemente, formar a camada basal do epitélio estratificado metaplásico da zona de transformação (Figura 4). Há controvérsia quanto à natureza do receptor da superfície celular que permite a ligação inicial do vírus à célula, a maioria dos estudos sugere uma dependência da presença de sulfato de heparina (Giroglou *et al.*, 2001; Longworth & Laimins, 2004; Doorbar *et al.*, 2006; Kanodia *et al.*, 2007). Após penetração e desnudamento do vírus, o genoma do HPV é mantido como epissomo no núcleo das células basais, com

um baixo número de cópias, aproximadamente 50 a 100 cópias por célula (Doorbar *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006; Bodily & Laimins, 2011).

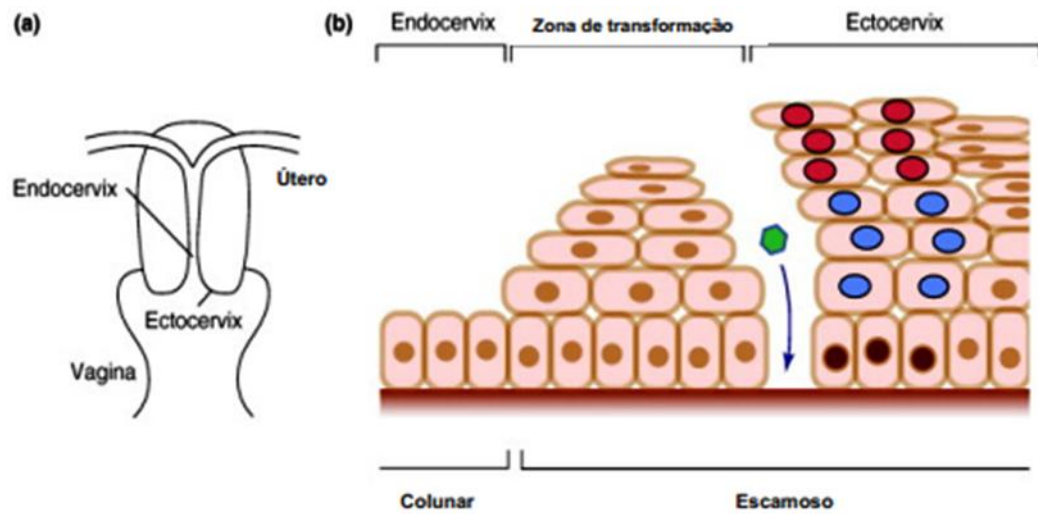


Figura 4 - Estrutura do epitélio cervical. (a) A localização do epitélio endocervical e ectocervical. (b) Esquema do epitélio estratificado ectocervical, do epitélio colunar endocervical, e da zona de transformação (ZT). Infecções por HPV e as suas lesões benignas e malignas, preferencialmente, desenvolvem-se na ZT. A infecção inicia através microlesões que expõem a membrana basal. Fonte: Bodily & Laimins, 2011.

No epitélio não infectado, células basais param de se multiplicar, migram para a camada de células suprabasais e iniciando o processo de diferenciação terminal. Quando se dividem, as células infectadas pelo HPV distribuem o DNA episossomal entre as duas células filhas, assim, enquanto o processo de diferenciação e maturação é iniciado por uma delas, a outra célula serve como um reservatório do DNA viral permanecendo indiferenciada na camada basal (Doorbar *et al.*, 2005; Scheurer *et al.*, 2005, McBride *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2006).

Os tipos de HPV encontrados preferencialmente em cânceres cervicais e anogenitais são designados como HPV de alto risco (HR-HPV), enquanto aqueles encontrados em verrugas genitais e lesões benignas são denominados HPV de baixo risco (LR-HPV). Os LR-HPV mais comuns são o HPV-6 e o HPV-11, enquanto que os HR-HPV mais prevalentes são os HPV-16, -18, -31 e -45. Considerado o tipo mais carcinogênico, o HPV-16 é responsável por 55% a 60% dos casos de câncer cervical, sendo o HPV-18 responsável por 10% a 15% dos casos. Os demais tipos de HR-HPV (HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-52, HPV-58, HPV-59, HPV-68 e HPV-67) causam os 25% a

30% dos casos remanescentes (Walboomers *et al.*, 1999; Munoz *et al.*, 2003; de Sanjose, 2010). Os vários tipos de HPV possuem uma organização genética comum e as diferenças entre HPV de alto e baixo risco são devido à diferença de aminoácidos em fatores comuns, e também à maior afinidade das oncoproteínas E6 e E7 dos HR-HPV com proteínas que regulam o ciclo celular (Lee *et al.*, 1998; Sanclemente & Gill, 2002; Lie & Kristensen, 2008; Conesa-Zamora, 2013).

As principais etapas para o desenvolvimento do câncer cervical incluem infecção da cérvix uterina, por um ou mais tipos oncogênicos do HPV, persistência viral, progressão para lesões pré-neoplásicas e carcinoma *in situ* ou invasor. No entanto, pode ocorrer uma reversão destas etapas, com eliminação da infecção pelo HPV e regressão das lesões pré-neoplásicas (Schiffman *et al.*, 2007; Steben & Franco, 2007).

Aproximadamente 90% das infecções pelo HPV são transitórias, tornando-se indetectáveis entre um a dois anos (Plummer *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2008). Presumivelmente tais infecções são controladas pelo sistema imune mediado por células ou permanecem em um estado de latência, caracterizado por uma expressão restrita das proteínas precoces virais E1 e E2. Se há falha imunológica no controle do vírus, uma infecção persistente, com altos níveis de replicação do HPV, é estabelecida (Ferenczy & Franco, 2002; Schiffman *et al.*, 2003; Bodily & Laimins, 2011).

As mulheres que possuem uma infecção persistente estão em risco significativo de desenvolver lesões pré-cancerosas. A persistência pode ser definida como a detecção do mesmo tipo de HPV duas ou mais vezes por um período de tempo. Não existe consenso deste tempo de detecção, e sim uma tendência de se considerar 18 meses, de acordo com o curso natural da infecção genital por HR-HPV. Na ausência de regressão, as lesões intraepiteliais podem persistir e, podem em alguns casos, progredir para câncer cervical invasor.

A persistência do HPV na mucosa cervical é crucial para o desenvolvimento da neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e do câncer cervical invasor (CCE) [Schiffman *et al.*, 2003; Doorbar *et al.*, 2006]. As lesões cervicais de baixo grau (NIC 1) relembram infecções produtivas causadas por HPV, enquanto as lesões de alto grau (NIC 2 e NIC 3) têm uma fase proliferativa com

ruptura do gene da proteína E2 causada pela integração do DNA do vírus no genoma celular (Middleton *et al.*, 2003; Thomison III *et al.*, 2009). A integração do genoma viral preserva regiões que codificam as oncoproteínas E6 e E7. Visto que E2 regula negativamente a expressão de E6 e E7, sua perda causada pela integração do genoma viral resulta na expressão descontrolada de E6 e E7. Assim, os eventos mais importantes na progressão da lesão produtiva para uma neoplasia de alto grau são resultado da desregulação na expressão das proteínas E6 e E7, que leva ao aumento da proliferação celular nas camadas inferiores do epitélio e à inabilidade para reparar corretamente o DNA celular (Doeberitz, 2002). A progressão de NIC 3 para câncer cervical invasor usualmente ocorre nas lesões que contêm cópias múltiplas do genoma viral integrado ao genoma celular, com consequente expressão elevada de E7 e instabilidade genômica celular (zur Hauser, 2002; Doorbar *et al.*, 2005).

A persistência por um ano (Castle *et al.*, 2009) e dois anos (Kjaer *et al.*, 2010) especialmente com o HPV-16, pode predizer um diagnóstico de NIC 3 ou diagnósticos mais severos nos anos subsequentes. Por exemplo, pacientes infectadas com HPV-16 por 1 a 2 anos apresentam um risco de 20 a 30% de desenvolver NIC 3 nos próximos 5 anos. Vale ressaltar que a lesão NIC 3 não tratada tem 30% de probabilidade de se tornar câncer invasor, ao passo que, lesões de NIC 3 tratadas apresentam apenas 1% de chance de se tornarem invasivas (McCredie *et al.*, 2008).

De acordo com a International Agency for Research on Cancer (IARC), há a necessidade da presença adicional de alguns fatores de risco ou cofatores que aumentam o risco de progressão das lesões em direção ao câncer cervical (IARC-WHO, 2015). Os cofatores que predisõem ou potencializam o surgimento e manutenção da infecção por HPV e/ou do câncer do colo uterino são:

(i) o baixo nível socioeconômico, provavelmente capaz de determinar níveis inferiores de educação sexual e condições de maior promiscuidade (IARC-WHO, 2015; INCA, 2014);

(ii) o início precoce da atividade sexual, a presença de outras doenças sexualmente transmissíveis (DST), a multiplicidade de parceiros e a multiparidade, provavelmente devido à maior chance de exposição, nesses grupos, ao HPV. Além disto, no caso da multiparidade a correlação também se

faz, devido à influência hormonal e aspectos imunológicos do período além dos traumatismos relativos ao trabalho de parto (Baseman & Koutsky, 2005; Castellsagué, Bosh, Muñoz, 2002; IARC-WHO, 2015; INCA, 2014);

(iii) o uso do tabaco com a infecção persistente por HPV de alto risco e com a presença de NIC de maior grau. Acredita-se que o tabaco estimule a carcinogênese e diminua a resposta do hospedeiro à infecção viral (Castellsagué, Bosh, Muñoz, 2002; IARC-WHO, 2015; INCA, 2014);

(iv) o uso de anovulatórios, pois foi sugerido que estas drogas estimulam a integração do DNA do HPV no genoma do hospedeiro e também a produção de proteínas virais oncogênicas (Castellsagué, Bosh, Muñoz, 2002; IARC-WHO, 2015; INCA, 2014).

3.2 Neoplasia intraepitelial cervical

O tipo histológico mais comum do câncer do colo do útero é o carcinoma de células escamosas (CCE), representando cerca de 90% dos casos. O CCE é precedido por uma longa fase de doença pré-invasiva, denominada neoplasia intraepitelial cervical (NIC). O conceito de NIC foi empregado, em 1973 por Richard, para se referir a um espectro de alterações citológicas e arquiteturais intraepiteliais que se iniciariam com a displasia leve e culminariam com o carcinoma invasor (Crum *et al.*, 2005). Esta classificação tem grande importância histórica e prática porque representa o principal modelo teórico de identificação morfológica de lesões precursoras de câncer cervical (Mount *et al.*, 2003). A classificação de Richards determina a existência de três graus de lesões precursoras: (i) NIC 1, equivalente à displasia leve e com distúrbios celulares comprometendo o terço inferior do epitélio; (ii) NIC 2, equivalente à displasia moderada e com distúrbios celulares comprometendo os dois terços inferiores do epitélio e; (iii) NIC 3, correspondendo à displasia acentuada, severa ou carcinoma *in situ* e com distúrbios celulares comprometendo toda a espessura do epitélio (Mount *et al.*, 2003).

Ao final de 1980, para aproximar a classificação morfológica com a própria história natural destas lesões intraepiteliais cervicais associadas à infecção por HPV, o sistema Bethesda de classificação das lesões cervicais pré-invasivas foi introduzido, sendo o mesmo publicado em 1991 e revisado em

2001. Tal sistema divide as lesões cervicais em dois grupos funcionais. A classificação Bethesda utiliza o termo genérico lesão intraepitelial escamosa (LIE) (do inglês *Squamous Intraepithelial Lesions* ou SIL) de baixo grau (LIEBG), do inglês *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions* ou LSIL, ou de alto grau (LIEAG), do inglês *High-grade Squamous Intraepithelial Lesions* ou HSIL. As lesões LIEBG ou LSIL correspondem à NIC 1 e as LIEAG ou HSIL correspondem às NIC 2 e NIC 3. Desta forma, a interpretação das lesões epiteliais precursoras do câncer cervical permite a correlação com a sua patogênese, ou seja, a observação das características morfológicas de uma infecção produtiva por HPV na LIEBG ou NIC 1 e as características marcantes das atipias celulares e arquiteturais da LIEAG ou NIC 2/NIC 3 (Crum, 2003; Mount et al., 2003; Schneider, 2003; Crothers, 2005; Claeys et al., 2006).

No Brasil, as nomenclaturas dos exames citopatológicos e histopatológicos seguem, respectivamente, a classificação histológica de Richart, de 1967, e citológica do Sistema Bethesda, de 2001, como mostrado na Figura 5 (Diretrizes para o rastreamento do câncer do colo do útero/INCA, 2011).

Classificação citológica de Papanicolaou	Classificação histológica da OMS	Classificação histológica de Richart	Classificação Citológica Brasileira
Classe I	-	-	-
Classe II	-	-	Alterações benignas
-	-	-	ASC
Classe III	Displasia leve	NIC 1	LIEBG
	Displasias moderada e acentuada	NIC 2/3	LIEAG
Classe IV	Carcinoma <i>in situ</i>	NIC 3	LIEAG
Classe V	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor

Figura 5 - Nomenclatura citológica e histopatológica das lesões precursoras e do câncer do colo do útero. Fonte: Modificado das Diretrizes para o rastreamento do câncer do colo do útero/INCA, 2011.

Tal correspondência citológica e histológica é caracterizada por alterações celulares e arquiteturais intraepiteliais observadas nas três classes de lesões precursoras do câncer do colo do útero: LIEBG ou NIC 1, equivalem à atipia ou displasia leve e com distúrbios celulares comprometendo o terço inferior do epitélio; já a LIEAG ou NIC 2/3, equivalem à atipia ou displasia moderada/acentuada e com distúrbios celulares comprometendo os dois terços inferiores/toda a espessura do epitélio do epitélio como ilustrado nas Figuras 6 e 7 (Mount *et al.*, 2003; Crum *et al.*, 2005).

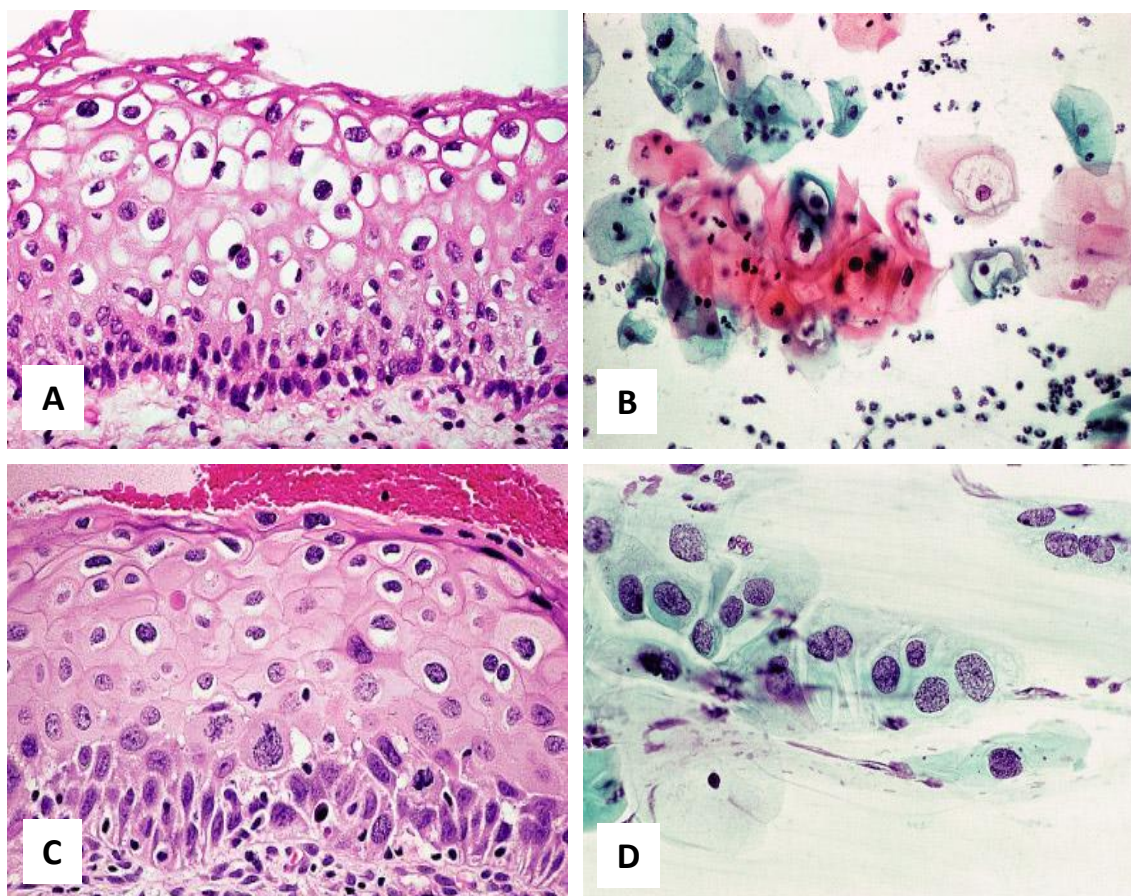


Figura 6 - Histologia e citologia da infecção por HPV e da NIC1/LIEBG. A e B – Característica histopatológica e citopatológica da infecção produtiva por HPV, representadas por coilócitos nas camadas superficiais do epitélio e nas células superficiais e intermediárias esfoliadas. Os coilócitos apresentam cariomegalia, hiper cromasia nuclear, irregularidade do contorno da carioteca e halo claro citoplasmático perinuclear com reforço periférico. Presença também de células inflamatórias. C – NIC 1: Atipias das células basais epiteliais restritas ao terço inferior epitelial e representadas por cariomegalia, cromatina heterogênea e figura atípica de mitose. Observam-se linfócitos intraepiteliais. D – LIEBG: Agrupamento de células intermediárias com cariomegalia, cromatina heterogênea, nucléolos inconspícuos e aumento da relação núcleo/citoplasma. A e C: HE com aumento de 400X; B e D: Papanicolaou com aumento de 400X. Fonte: Pascoal-Xavier, 2011.

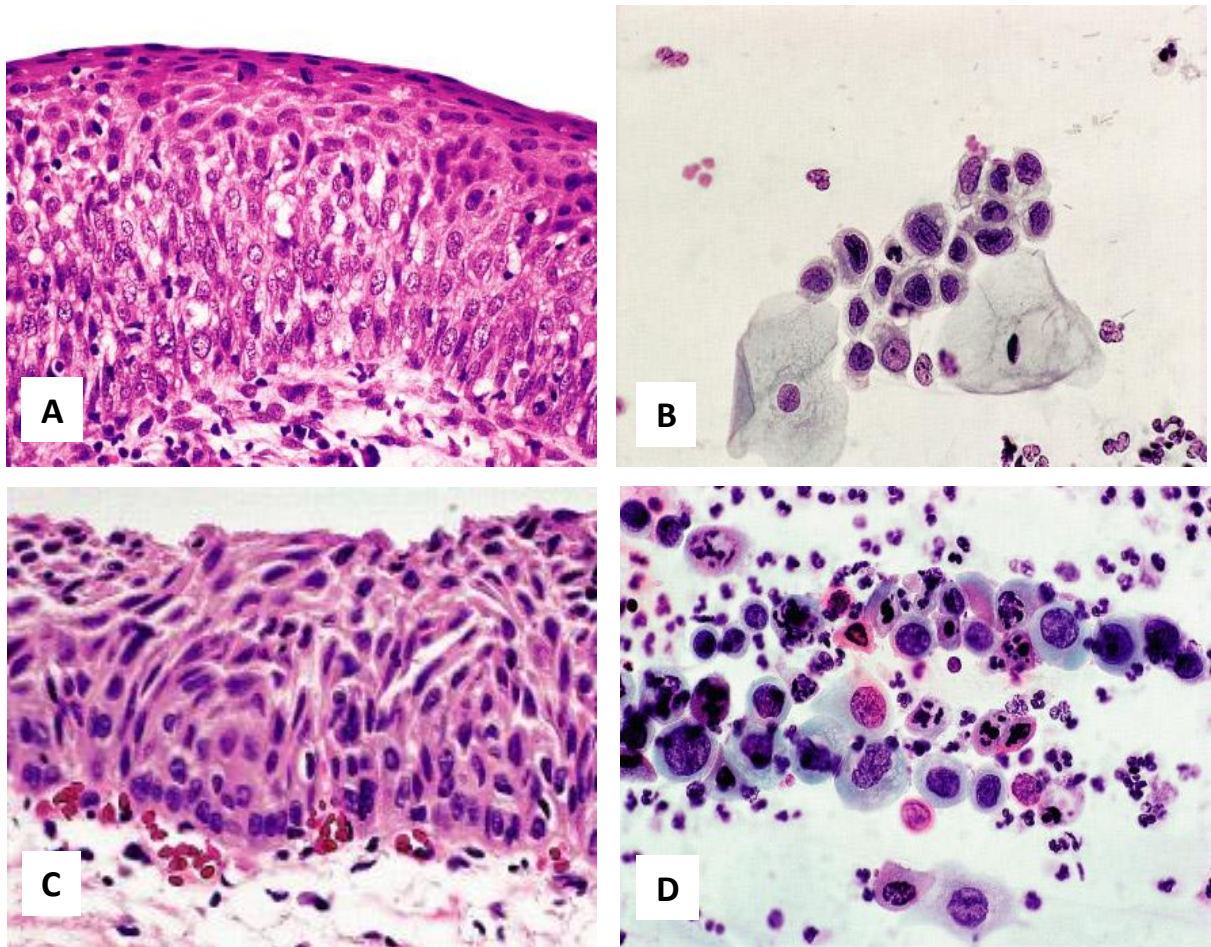


Figura 7 - Histologia e citologia da mucosa ectocervical com NIC3/LIEAG.

A - Epitélio escamoso com atipias das células basais comprometendo dois terços da espessura total e diferenciação escamosa restrita ao terço superficial do epitélio. As células basais atípicas caracterizam-se por cariomegalia, hiper Cromasia nuclear, cromatina heterogênea. B - Agrupamento de células basais atípicas com grande aumento da relação núcleo/citoplasma, hiper Cromasia nuclear e contornos irregulares da carioteca. C – NIC 3: Proliferação de células atípicas comprometendo toda a espessura do epitélio, sem evidência de diferenciação e maturação escamosa. D – LIEAG: Células com maturação anormal, disceratóticas, com hiper Cromasia nuclear e cromatina grosseira, em meio a exsudato inflamatório neutrofílico. A e C: HE com aumento de 400X; B e D: Papanicolaou com aumento de 400X. Fonte: Pascoal-Xavier, 2011.

3.3 Atipias de significado indeterminado em células escamosas

Com o objetivo de reduzir a variabilidade do diagnóstico diferencial entre alterações celulares benignas e alterações celulares verdadeiramente atípicas, o sistema Bethesda de classificação citopatológica introduziu a classe atipias de significado indeterminado em células escamosas – ASC (sigla inglesa para *Atypical Squamous Cells*). A classe ASC é definida como alterações celulares insuficientes para o diagnóstico de lesão intraepitelial, e é subdividida em células escamosas atípicas de significado indeterminado ou ASC-US (sigla inglesa para *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*), e em células escamosas atípicas não podendo se excluir lesão de alto grau ou ASC-H (sigla inglesa para *atypical squamous cells sendo o H referente à HSIL*) [Solomon *et al.*, 2002]. Essa subclassificação foi adotada no Brasil, a partir de 2002 (Diretrizes para o rastreamento do câncer do colo do útero - INCA, 2011).

A prevalência do diagnóstico citológico de ASC-US no Brasil, em 2009, foi de 1,2% dentre todos os exames realizados e de 46% considerando-se apenas os resultados alterados. Já a prevalência do diagnóstico citológico ASC-H foi de 0,2% dentre todos os exames realizados e de 7% considerando-se também os resultados alterados. Nessa categoria de ASC, a prevalência de LIEAG variou entre 12,2% e 68% e a de CCE em torno de 1,3% a 3% (Diretrizes para o rastreamento do câncer do colo do útero - INCA, 2011).

O rastreamento de ASC-US e ASC-H pelo exame citopatológico, assim como o de LIEBG e LIEAG (Figura 8), recomenda, para ASC-US, a repetição do exame citopatológico em intervalos de 6 meses, em mulheres com 30 anos ou mais, e de 12 meses em mulheres com idade inferior a 30 anos. Todas as mulheres com laudo citopatológico de ASC-H devem ser encaminhadas à unidade secundária para colposcopia e biópsia.

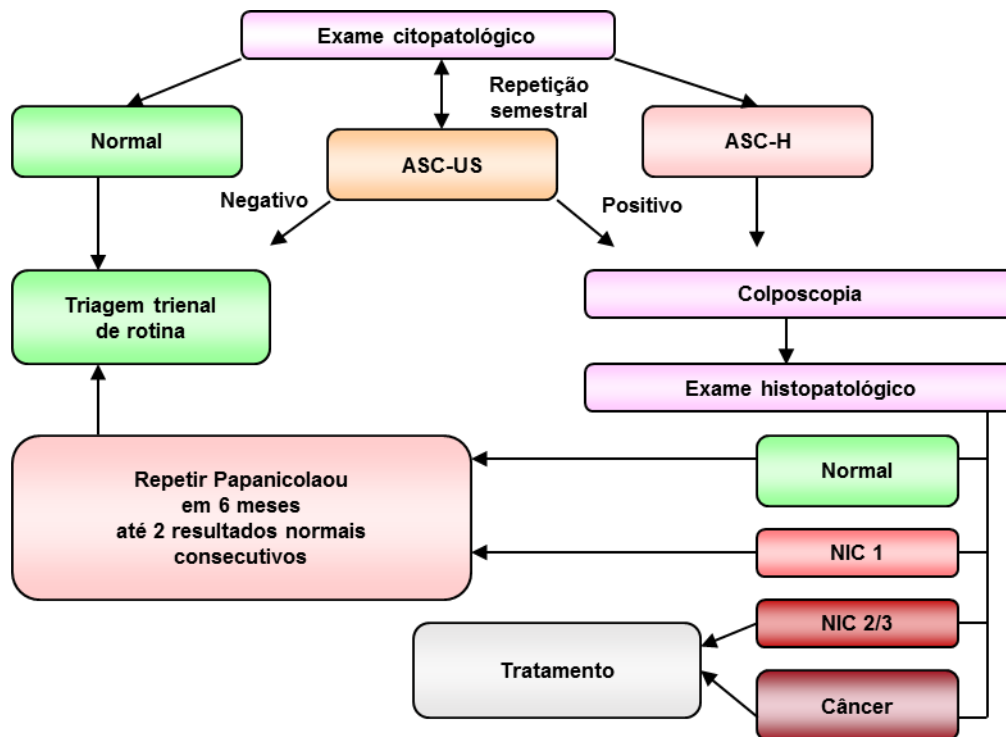


Figura 8 - Fluxograma de recomendações de condutas para diagnósticos citopatológicos de ASC-US e ASC-H no Brasil. Fonte: Adaptado de Gravitt *et al.*, 2005.

A reprodutibilidade do diagnóstico citopatológico de ASC é pobre, pois estudos interobservadores demonstraram a parca concordância entre citopatologistas, variando de 35% a 45%. Além disso, frequentemente se observa a presença de NIC nas biópsias de pacientes com diagnóstico prévio de ASC. Em estudo brasileiro, avaliando pacientes com ASC-US, foram observados os seguintes percentuais: 9% de NIC 1, 6% de NIC 2 e 3% de NIC 3 (Barcelos *et al.*, 2006). No caso do diagnóstico citopatológico de ASC-H, verificou-se presença de cerca de 50% de NIC 2/3 no exame histopatológico (Huitron *et al.*, 2008).

O diagnóstico de ASC requer definições claras de tratamento. No entanto, o manejo clínico de mulheres com ASC é particularmente problemático porque este diagnóstico pode indicar várias condições diferentes, incluindo alterações de células reativas e o desenvolvimento de estágios pré-neoplásicos ou neoplásicos. Além disso, há controvérsias sobre os procedimentos mais adequados para evitar a evolução de ASC para lesões cervicais mais avançadas (Paesi *et al.*, 2015). A implantação de métodos de biologia

molecular, como a pesquisa de DNA do HPV de alto risco, para orientar a conduta médica de pacientes com ASC ainda é considerada economicamente inviável para o Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil. (Diretrizes para o rastreamento do câncer do colo do útero - INCA, 2011).

3.4 Epidemiologia da infecção genital por HPV e neoplasia cervical no Brasil

A infecção genital pelo HPV é a infecção sexualmente transmissível mais comum entre jovens nos países em desenvolvimento. Cerca de 290 milhões de mulheres no mundo são portadoras do HPV. No Brasil, cerca de 50% da população em idade reprodutiva é infectada pelo HPV genital, e a maioria das mulheres sexualmente ativas será infectada ao longo da vida (Baseman & Koutsky, 2005; Carvalho *et al.*, 2005; Scheurer *et al.*, 2005; Burchell *et al.*, 2006; Trottier *et al.*, 2006; INCA, 2014).

Em 2009, a prevalência de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LIEBG), no Brasil, foi de 0,8% entre todos os exames citopatológicos realizados. Considerando-se apenas os exames com resultado anormal, a prevalência de LIEBG é de 31%, representando o segundo diagnóstico citopatológico mais frequente, precedida apenas pela categoria ASC-US que é de 46% de todos os resultados alterados. A prevalência de LIEAG é de 0,25% de todos os exames realizados e 9,7% de todos os exames com resultado anormal. Cerca de 70% a 75% das pacientes com laudo citológico de LIEAG confirmam este grau de doença no exame histopatológico da biópsia, no entanto, 1% a 2% terão diagnóstico histopatológico de carcinoma invasor (Diretrizes para o rastreamento do câncer do colo do útero - INCA, 2011).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, o câncer cervical corresponde a 5,7% dos casos de câncer, com uma estimativa de 15.590 novos casos em 2014, o que representa 15,33 casos a cada 100 mil mulheres, ficando atrás somente do câncer de mama (20,8% dos casos de câncer) e do colorretal (6,4% dos casos de câncer), (INCA, 2014). O câncer cervical é mais frequente na região Norte representando 23,57% de todos os casos de câncer no sexo feminino. Nas regiões Centro-Oeste (22,19/ 100 mil) e Nordeste (18,79/ 100 mil), é o segundo tipo de câncer mais frequente. Na

região Sudeste (10,15/100 mil), o quarto e, na região Sul (15,87 /100 mil), o quinto mais frequente. Na Região Sudeste continua o terceiro tumor mais frequente em mulheres, com 7,8% do total de casos novos. Nas capitais dos Estados da Região Norte a sua incidência estimada é de 37,23 casos por 100.000 mulheres, ou seja, maior que o dobro da média nacional (INCA, 2014).

3.5 Prevenção e diagnóstico da neoplasia intraepitelial cervical

Atualmente existem duas vacinas, comercialmente disponíveis contra o HPV, ambas protegem contra os tipos de HPV-16 e -18 (vacina bivalente Cervarix produzida pela Glaxo Smith Kline), sendo que a vacina Gardasil produzida pela Merck protege também contra os tipos de HPV-6 e -11 de baixo risco (vacina tetravalente). Tais vacinas consistem de partículas semelhantes a vírus (VLP, sigla inglesa para *viral like particle*) produzidas por tecnologia de DNA recombinante, sendo, portanto, não infecciosas. Na maioria das vezes, ambas mostraram alta eficiência para mulheres sem evidências de infecções prévias, com redução de mais de 90% de infecções persistentes e redução próxima a 100% de lesões cervicais moderadas e severas (Schiffman *et al.*, 2007; Schiffman *et al.*, 2011; Bonanni *et al.*, 2015; Gilmer, 2015).

Em março de 2014, o Sistema Único de Saúde (SUS) do Ministério da Saúde passou a ofertar a vacina tetravalente contra HPV, utilizada na prevenção do câncer do colo do útero, para meninas de 11 a 13 anos. Em 2015, serão vacinadas as adolescentes de 9 a 11 anos e, em 2016, começarão a ser imunizadas as meninas que completam 9 anos. O esquema de vacinação é composto por três doses: a segunda é aplicada com intervalo de seis meses e a terceira, de reforço, cinco anos após a primeira dose. Mais de 4,1 milhões de meninas já receberam a primeira dose da vacina. O número representa 83,5% do público-alvo, formado por 4,9 milhões de adolescentes na faixa-etária de 11 a 13 anos (Ministério da Saúde, 2015).

3.5.1 Teste de Papanicolaou

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

Desde sua criação por George Papanicolaou, em 1940, o método denominado de citologia oncótica ou teste de Papanicolaou, permanece essencialmente o mesmo, baseando-se na interpretação morfológica de esfregaços de células epiteliais da superfície do colo uterino. Dentre os critérios citológicos selecionados para análise, incluem-se tamanho nuclear/tamanho celular, forma do núcleo, intensidade de coloração do núcleo, forma da membrana nuclear, dentre outros (Doeberitz, 2002; Gravitt *et al.*, 2005).

O sucesso do teste de Papanicolaou é dependente de vários fatores pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos como a experiência do ginecologista, a coleta adequada das amostras, fixação imediata dos esfregaços em álcool, interpretação padronizada dos achados citopatológicos, seguimento clínico do teste anormal, tratamento da lesão precursora confirmada e, fundamentalmente, a frequência de repetição do teste (Gravitt *et al.*, 2005; Tambouret, 2013).

Poucas evidências apoiam a recomendação de rastreamento anual do câncer cervical em mulheres de qualquer idade, pois esta conduta pouco contribui para o aumento na prevenção deste câncer e ainda gera um custo excessivo e desnecessário de procedimentos e tratamentos (Stout *et al.*, 2008; Kulasignam *et al.*, 2011). Dessa forma, os intervalos de triagem devem ser recomendados com base na idade e no histórico clínico da paciente (Saslow *et al.*, 2012). Para mulheres com idade entre 21 e 29 anos, o rastreamento com citologia é recomendado a cada três anos. Devido à alta prevalência do HPV em mulheres até 30 anos recomenda-se que o teste para genoma do HPV deve ser utilizado em mulheres deste grupo. Para mulheres com idade entre 30 e 65 anos o Guia para a Prevenção e Detecção Precoce do Câncer Cervical, publicado em 2012, recomenda o rastreamento conjunto por citologia e teste para HPV a cada 5 anos (recomendável) ou apenas citologia a cada 3 anos (aceitável) considerando-se um histórico de rastreamento com testes negativos

consecutivos (Peyton *et al.*, 2001; Dunne *et al.*, 2007; Saslow *et al.*, 2012; INCA, 2014)

A rotina recomendada para o rastreamento do câncer cervical no Brasil é a repetição do exame Papanicolaou a cada três anos, após dois exames normais consecutivos realizados em um intervalo de um ano, priorizando mulheres entre 25 e 60 anos (INCA, 2014). O rastreamento pelo teste de Papanicolaou tem obtido grande sucesso na redução da incidência de câncer e mortalidade em países onde o rastreamento de boa qualidade é disponível, ainda que resultados falso-positivos e falsos negativos sejam comuns (ALTS, 2003; Castle & Carreon, 2010).

Diante de um teste de Papanicolaou anormal, ou seja, apresentando como resultado células atípicas de significado indeterminado (ASC) ou lesão intraepitelial escamosa de baixo ou de alto grau, é indicada uma colposcopia. A colposcopia é um procedimento que permite uma visão estereoscópica aumentada (normalmente de 6 a 40 vezes) da cérvix (colo do útero) e da vagina, obtida com o auxílio de um espéculo vaginal e do colposcópio, após a aplicação de solução de ácido acético a 3-5% que cora o colo do útero para facilitar as análises. O colposcópio consiste de um microscópio binocular com uma fonte de luz com intensidade variável. O exame histopatológico é necessário quando uma área suspeita é identificada no exame colposcópico. Vale ressaltar que o exame histopatológico é considerado o padrão ouro no diagnóstico do câncer cervical (Gravitt *et al.*, 2005).

A ocorrência de exames citopatológicos falso-negativos e insatisfatórios motivou a discussão para incorporação de novas tecnologias visando à melhora da qualidade e acurácia do teste de Papanicolaou. Os algoritmos atuais para o diagnóstico da neoplasia cervical recomendam o uso de testes diagnósticos para a detecção do DNA do HPV em caso de citologia alterada. Estes testes para verificação do DNA do HPV utilizam as metodologias da captura híbrida e da reação em cadeia da polimerase (PCR). A captura híbrida é um teste de hibridização molecular com detecção dos híbridos DNA/RNA por reação enzima-substrato e leitura por quimioluminescência. A captura híbrida é desenhada para detectar um ou mais dos treze tipos de HPV mais associados com a neoplasia cervical (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68). Testes para verificação do DNA do HPV são usados para melhor

interpretar resultados equivocados no rastreamento, por exemplo, ASC-US, ou em combinação com a colpocitologia como um método mais sensível. Os resultados positivos para HPV no teste de DNA também indicam o exame colposcópico. Durante a colposcopia, as áreas do colo uterino suspeitas de lesão são biopsiadas para exame histopatológico e diagnóstico final (Gravitt *et al.*, 2005).

3.5.2 Citologia em meio líquido

Outra metodologia disponível para a triagem do câncer do colo uterino é a citologia de monocamada em meio líquido (CBL) aprovada pelo FDA americano (USA Food and Drug Administration). Nesta técnica, células do raspado cervical são colocadas imediatamente em uma solução fixadora. Para o exame, as células cervicais são dispersas, colocadas em um filtro e transferidas para uma lâmina de microscópio para interpretação em forma de monocamada. Uma vez que as células são rapidamente fixadas após a coleta, poucos artefatos morfológicos celulares ocorrem e também poucas células na lâmina são encobertas, uma vez que o processo reduz a quantidade de outros materiais, como sangue e muco.

Amostras coletadas por citologia em meio líquido também podem ser utilizadas para a preparação de blocos de células (*cell blocks*), técnica que oferece outras vantagens ao exame citopatológico. A técnica de bloco celular (CB) foi introduzida há mais de um século atrás, em 1896, usando celoidina como meio de inclusão. No entanto, ganhou ampla aceitação como uma ferramenta de diagnóstico, em 1947. Preparações de bloco de células são usadas rotineiramente, geralmente como complemento das lâminas citológicas, para citologia esfoliativa de fluidos da cavidade corporal e material de punção aspirativa por agulha fina (PAAF). A utilização de citologia em meio líquido (CBL) permite que tanto material citológico ginecológico e não ginecológico possam ser estudados em preparações de bloco de células (Jain *et al.*, 2014).

As principais vantagens dos blocos de células são: servem como uma fonte adicional de material, com cortes seriados do mesmo exemplar para oferecer ou repetir análises moleculares para futuros estudos de diagnóstico e pesquisa. Tal como blocos de histologia em parafina, fixados em formalina, os

blocos de células permitem a preservação das amostras por longo período. Entretanto, um número ainda muito limitado de estudos abordaram a preparação de blocos de células em material de citologia cervico-vaginal (Freitas *et al.*, 2001; Akpolat *et al.*, 2004; Halloush *et al.*, 2008; Shidham *et al.*, 2011; Kossakowski *et al.*, 2014).

3.6 Limitações/Desafios no diagnóstico do câncer cervical

Apesar da disponibilidade das duas vacinas recombinantes contra os HPV tipos 6, 11, 16 e 18 ser um importante passo na batalha contra o câncer cervical, supostamente tais vacinas não oferecem proteção para indivíduos que já foram expostos aos HR-HPV, não resolvem infecções ou lesões existentes e não protegem contra todos os tipos de HR-HPV já descritos (Schiffman *et al.*, 2007; Castellsague *et al.*, 2011).

Além disso, os exames citológicos e histológicos geram elevadas taxas de resultados, falso negativo e falso positivo, e grande variabilidade de interpretação interobservadores, o que certamente prejudica a decisão clínica sobre o tratamento. O desempenho do teste de Papanicolaou é severamente prejudicado pela elevada variabilidade inter e intraobservador e altas taxas de resultado falso negativo e falso positivo, respectivamente entre 20 a 30% e 50 a 70% (Tsoumpou *et al.*, 2009; Litjens *et al.*, 2013). Apesar da análise histopatológica de biópsias do colo uterino ser considerada como padrão ouro para o diagnóstico de NIC, esta também apresenta grande variabilidade de interpretação interobservador culminando em erros na determinação do grau da NIC, em 30 a 50% dos casos (Schiffman *et al.*, 2007; Thomison III *et al.*, 2009; Schiffman *et al.*, 2011).

Os testes moleculares para detecção do DNA do HPV nas amostras cervicais também falham na triagem de lesões intraepiteliais, pois não permitem a distinção entre infecção transitória e infecção crônica ou persistente, podendo levar ao acompanhamento desnecessário ou tratamento excessivo da paciente e, conseqüentemente, aumento de custos dos serviços de saúde. Além disso, a PCR apresenta variabilidade de 35 a 90%. Já a citologia em meio líquido (CBL) não é mais sensível ou mais específica do que a citologia convencional e também apresenta limitações, especialmente no

diagnóstico diferencial entre alterações celulares benignas e displásicas (Diretrizes para o rastreamento do câncer do colo do útero - INCA, 2011).

Mortes causadas pelo câncer cervical também são devido a resultados falso negativos. Erros de amostragem ocorrem quando células anormais na lâmina do exame de Papanicolaou são perdidas ou mal interpretadas. O erro mais comum de amostragem é a ausência de células da zona de transformação cervical (Buntinix *et al.*, 1996). A determinação precisa da sensibilidade e especificidade em testes citológicos é importante porque tais parâmetros devem ser utilizados para orientar decisões como recomendações da frequência ótima de rastreamento e acompanhamento de lesões de grau intermediário.

Os principais métodos atualmente disponíveis para o rastreamento do câncer cervical apresentam importantes limitações para indicar, com precisão, o significado das alterações decorrentes da progressão da NIC, bem como distinguir a infecção viral produtiva, predominante na lesão intraepitelial de baixo grau (LIEBG) e não associada diretamente à transformação neoplásica, da infecção não produtiva, predominante na lesão intraepitelial de alto grau (LIEAG), com integração viral no genoma celular, e diretamente associada à transformação neoplásica (Doeberitz, 2002; Thomison III *et al.*, 2009; Schiffman *et al.*, 2011).

Tais questões elevam a importância de se obter biomarcadores capazes de indicar em quais circunstâncias as lesões são transitórias ou não, além de facilitar o diagnóstico correto do grau da lesão, evitando tratamentos desnecessários.

3.7 Biomarcadores da displasia epitelial cervical

Considerando-se as limitações do diagnóstico citopatológico e de suas inovações, vários estudos tentam identificar métodos e moléculas reguladoras do ciclo e da proliferação celulares úteis na determinação da progressão da neoplasia intraepitelial cervical. As moléculas celulares mais estudadas são as proteínas p16^{INK4A} (p16), p14, Ki-67, MCM2, MCM5, MCM7, topoisomerase 2 (TOP2A, p105, p107, RB2/p130, E2F4, p21 e Ciclina A (Santopietro *et al.*, 2006; Lobato *et al.*, 2012).

O ProEx™C é um ensaio imunocitoquímico composto por dois anticorpos monoclonais que reconhecem a TOP2A e a MCM2, que apresentam expressão aumentada em câncer cervical (Chen *et al.*, 2003; Malinowski, 2007; Santin *et al.*, 2005). A TOP2A é uma enzima que desenrola o DNA em preparação para a replicação, transcrição, segregação cromossomal e progressão do ciclo celular e a MCM2 é um marcador de proliferação celular (Badr *et al.*, 2008).

Vale ressaltar que a proteína p16^{INK4A} (doravante abreviada como p16) é o biomarcador diagnóstico da neoplasia cervical mais estudado. A p16, produto do gene CDKN2, é uma proteína supressora de tumor que inibe os complexos ciclina D/ciclina dependentes de cinases (CDK)-4 e -6, as quais regulam o ponto de checagem da fase G1 do ciclo celular (Serrano *et al.*, 1993; Koh *et al.*, 1995). Como mostrado na figura 9, as CDKs fosforilam a proteína retinoblastoma (pRB), o que resulta em uma mudança conformacional e liberação do fator de transcrição E2F pela pRB. Assim, a inativação da função tanto de p16 ou de pRB permite que a célula entre na fase S após apenas uma pausa no ponto de checagem de G1 (Sano *et al.*, 1998). A oncoproteína viral E7 se liga à pRB inativando-a (Dyson *et al.*, 1989). Visto que expressão de p16 parece estar envolvida em um *feedback* negativo de pRB, a diminuição da proteína pRB leva a um aumento de p16. Em outras palavras, a inativação de pRB mediada por E7 resulta em elevados níveis de p16 em células infectadas com HR-HPV.

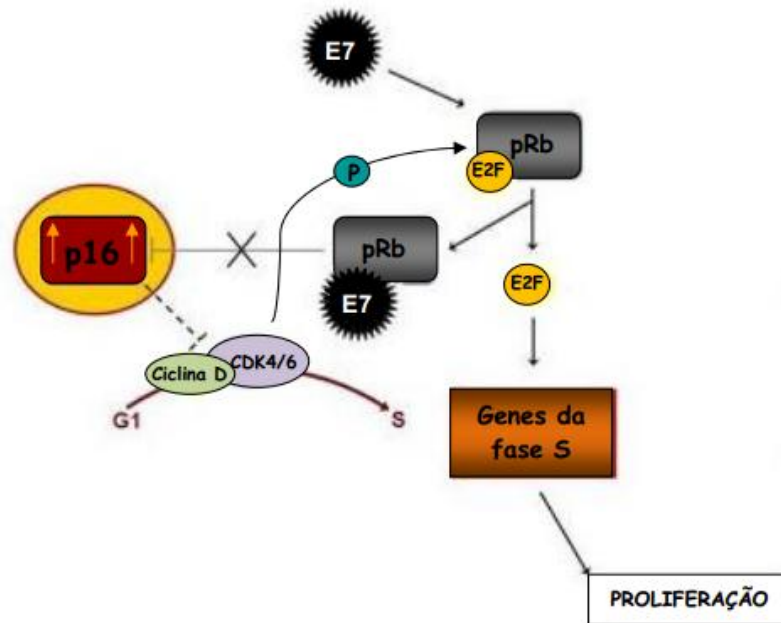


Figura 9 - Expressão aumentada de p16 no câncer cervical. A proteína supressora de tumor p16 inibe os complexos ciclina D/ciclinas dependentes de cinases (CDK)-4 e -6, os quais regulam o ponto de checagem da fase G1 do ciclo celular. Os complexos ciclina-CDKs fosforilam a proteína retinoblastoma (pRb), o que resulta em uma mudança conformacional e liberação do fator de transcrição E2F pela pRb, induzindo a expressão de genes da fase S. A inativação de pRb ocorre através da oncoproteína viral E7, que se liga à pRb impedindo-a de se ligar a E2F e, portanto, inativando-a. Devido a expressão de p16 estar envolvida em um feedback negativo de pRb, a diminuição de pRb em sua forma ativa leva a um aumento de p16. Assim a inativação mediada por E7 de pRb resulta em elevados níveis de p16 em células infectadas com HR-HPV. Fonte: <https://www.klinikum.uniheidelberg.de/index.php?id=113203&L=1>; adaptado.

Estudos iniciais utilizando imuno-histoquímica em biópsias de neoplasias intraepiteliais cervicais e carcinomas demonstraram a expressão aumentada de p16 e ausência de sua expressão em mucosa normal e estroma, abrindo a possibilidade da utilização de p16 como biomarcador para diferenciar neoplasias de câncer ou de lesões no colo uterino (Sano *et al.*, 1998). Já foi demonstrado que os padrões de imunocoloração com p16 são diferentes em biópsias cervicais infectadas com LR-HPV de biópsias infectadas com HR-HPV, fornecendo, portanto, informações valiosas sobre o tipo de HPV infectante sem a necessidade de testes moleculares como PCR, *Southern blotting* ou hibridização *in situ* (Sano *et al.*, 1998). Entretanto, esta abordagem é controversa devido à possibilidade de haver coloração de p16 em alguns tipos celulares normais como células endocervicais, células escamosas metaplásicas e atróficas, que embora sejam encontradas de forma menos

frequente e tenham uma coloração menos intensa, podem resultar em diagnóstico falso-positivo em algumas amostras (Trunk *et al.*, 2004).

A proteína Ki-67 é uma proteína não histona expressa no núcleo durante todo o ciclo celular, exceto nas fases G0 e G1, podendo ser detectada com o anticorpo MIB-1. Ki-67 constitui um marcador eficiente das células em proliferação e sua expressão tem sido associada a um aumento do grau de displasia cervical (Qiao *et al.*, 2005; Sarian *et al.*, 2006; Bahnassy *et al.*, 2007; Conesa-Zamora *et al.*, 2009). Além disso, tem sido proposta como um marcador de prognóstico do câncer cervical (Silva-Filho *et al.*, 2004) apesar de ser expressa em lesões proliferativas não neoplásicas. A função de Ki-67 ainda permanece desconhecida e não há evidências de que seja essencial para proliferação celular (Conesa-Zamora, 2013).

A expressão aumentada das proteínas p16 e Ki-67 tem sido extensivamente investigada e demonstra forte associação com displasia epitelial de alto grau. No caso particular da proteína p16, postula-se que ela contribui especialmente para o diagnóstico diferencial das lesões epiteliais de alto grau, que apresentam risco muito aumentado de progressão para o carcinoma invasor (Hu *et al.*, 2005; Kalof *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2005; Kalof *et al.*, 2006; Cuschieri *et al.*, 2008; Tsoumpou *et al.*, 2009; Walts *et al.*, 2009; Romagosa *et al.*, 2011).

A avaliação imunocitoquímica de variadas amostras do colo uterino, citologia em meio líquido, bloco de células epiteliais e biópsia parafinada, utilizando anticorpos primários para p16 e Ki-67, favorece a diminuição da variabilidade intra-observador no diagnóstico das lesões intraepiteliais cervicais, principalmente no diagnóstico das lesões intraepiteliais de alto grau. O kit comercial CINtecPLUS Cytology (Roche) detecta simultaneamente a expressão de p16 e Ki-67 por imunocitoquímica. Em células normais, a expressão simultânea destas proteínas não ocorre, uma vez que induzem efeitos opostos na célula (Schmidt *et al.*, 2011). Enquanto a proteína p16 tem ação anti-proliferativa, inibindo o ciclo celular; a proteína Ki-67 é detectada em células em proliferação. Sendo assim, a expressão de p16/Ki-67 na mesma célula, indica um ciclo celular desregulado decorrente, possivelmente, de oncoproteínas virais (E6 e E7), podendo proporcionar uma maior sensibilidade e especificidade na detecção de lesões (Hong *et al.*, 2013; Ridder *et al.*, 2013).

A dupla marcação de p16 e Ki-67 se mostrou promissora tanto para rastreamento primário, quanto para casos de citologias com atipias mínimas, uma vez que, se mostrou um teste sensível, sem decréscimo na especificidade (Yoshida *et al.*, 2011; Dona *et al.*, 2012; Loghavi *et al.*, 2012; Ravarino *et al.*, 2012; Byun *et al.*, 2013; Ridder *et al.*, 2013; Linxweiler *et al.*, 2014).

Entretanto, questões fundamentais para a avaliação clínica de p16 e Ki-67, como falta de padronização na preparação das amostras para imunocitoquímica e nos critérios para interpretação dos cortes histopatológicos, têm reduzido a reprodutibilidade do método e dificultando a interpretação dos dados de diferentes estudos. Por conseguinte, as evidências disponíveis não permitem a formulação de recomendações definitivas sobre as aplicações da p16 e Ki-67 na prática clínica (Akpolat *et al.*, 2004; Thomison III *et al.*, 2008, Tsoumpou *et al.*, 2009; Roelens *et al.*, 2012; Toll *et al.*, 2013; Kisser *et al.*, 2015).

Nosso grupo de pesquisa identificou e caracterizou a proteína celular RAP1 GTPase como um potencial biomarcador da neoplasia cervical, com potencial utilização no auxílio ao diagnóstico desse câncer (Pascoal-Xavier, 2008; 2011, Pascoal-Xavier *et al.*, 2015 [em anexo]). Os resultados deste estudo estão descritos no item 1.9.1 desta dissertação.

3.8 Proteína RAP1 GTPase

A proteína RAP1 foi descoberta por Kitayama e colaboradores, em 1989, como um produto do gene *k-rev*, capaz de suprimir o fenótipo maligno de fibroblastos transformados por K-RAS, codificada por um dos genes mutados de RAS (Kitayama *et al.*, 1989). Atualmente, as proteínas RAP1, em mamíferos, são conhecidas por agirem independentemente de RAS e suas funções compreendem o controle do estabelecimento da polaridade celular (Shimonaka *et al.*, 2003), ativação da adesão celular mediada por integrina (Tsukamoto *et al.*, 1999; Katagiri *et al.*, 2000; Reedquist *et al.*, 2000; Duchniewicz *et al.*, 2006), regulação do contato célula-célula (Hogan *et al.*, 2004; Price *et al.*, 2004), proliferação celular (Altschuler & Ribeiro, 1998) e secreção (D'Silva *et al.*, 1998; Crittenden *et al.*, 2004).

RAP1 é uma pequena GTPase pertencente a superfamília RAS e possui duas isoformas, RAP1A e RAP1B. RAP1A é 95% homóloga à RAP1B, diferindo em apenas nove aminoácidos (de um total de 184), seis dos quais estão localizados entre os aminoácidos 171 e 184 na extremidade C-terminal (Mitra *et al.*, 2003). RAP1 funciona como um interruptor molecular, regulando a sinalização de processos celulares como a proliferação, diferenciação, morfogênese e apoptose. Para ser ativada ou desativada, RAP1 se liga a moléculas GDP ou GTP, sendo que a ligação à GTP resulta na sua forma ativa e a ligação à GDP na sua forma inativa. O ciclo GDP-GTP é regulado pelos fatores de troca nucleotídeo guanina (GEF, sigla inglesa para *Guanine Exchange Factor*) que facilitam a liberação do nucleotídeo ligado e permitem que o GTP se religue. Já as proteínas ativadoras de GTPase (GAP, sigla inglesa para *GTPase Activating Protein*) induzem a hidrólise do GTP ligado e completam o ciclo (Figura 10) [Bos *et al.*, 2001].

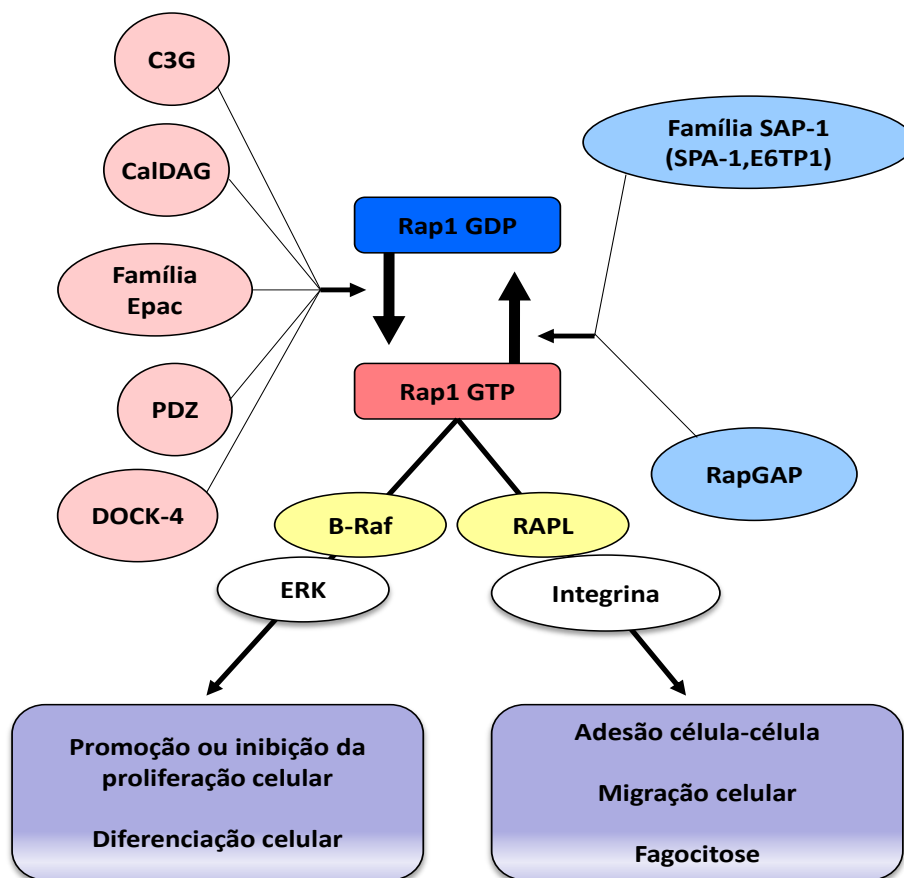


Figura 10 - Funções biológicas e regulação da proteína RAP1 GTPase. A proteína RAP1 encontra-se na célula no estado inativo, RAP1GDP, ou no estado ativo, RAP1GTP. A ativação de RAP1 é mediada pela ação de fatores permutadores do nucleotídeo guanina como C3G, CalDAG, Epac, PDZ e DOCK-4, e a inativação por proteínas ativadoras de

GTPase como E6TP1, SPA-1 e RapGAP. No estado ativo, RAP1 participa de importantes funções de diferenciação e regulação da proliferação celulares, por meio dos efetores moleculares B-Raf e ERK, além das relevantes funções mediadas por integrinas de adesão e migração celulares e fagocitose. Fonte: Adaptado de Kometani *et al.*, 2004

RAP1 é encontrada predominantemente em membranas intracelulares na região perinuclear, em vesículas endocíticas e exocíticas, e em menores quantidades em membranas plasmáticas (Pizon *et al.*, 1994; Farina *et al.*, 2004; Frische *et al.*, 2010). É particularmente abundante em plaquetas humanas nas quais está localizada principalmente na membrana plasmática e nos grânulos secretores, regulando a formação do grânulo e exocitose (Torti, 1992; Berger, 1994; Franke *et al.*, 1997; Farina *et al.*, 2004; Frische *et al.*, 2010). RAP1 também é abundantemente observada na membrana plasmática e em grânulos específicos de neutrófilos (Maridonneau and Gunzburg, 1992; Quinn *et al.*, 1992; Farina *et al.*, 2004; Frische *et al.*, 2010). Em fibroblastos é principalmente localizada no compartimento médio do Complexo de Golgi ou nos endossomos (Beranger *et al.*, 1991; Pizon *et al.*, 1994; Lafuente *et al.*, 2007; Frische *et al.*, 2010).

3.9 Expressão de RAP1 em tumores

A expressão alterada da proteína RAP1 e de seus reguladores (GEFs e GAPs) tem sido implicada no crescimento de células cancerosas, invasão e metástase (Hattori *et al.*, 2003; Frische *et al.*, 2010; Gloerich *et al.*, 2011). Vários estudos já demonstraram a expressão alterada de RAP1 e seus reguladores em distintas linhagens de células escamosas de carcinoma (CCE) de orofaringe, câncer oral (D'Silva *et al.*, 2003; Banerjee *et al.*, 2011), CCE de cabeça e pescoço (Banerjee *et al.*, 2012), câncer papilar da tireóide (Nellore *et al.*, 2009), câncer de mama (Furstenau *et al.*, 2011), carcinoma de células renais (Kim *et al.*, 2012), leucemia (Qiu *et al.*, 2012) e melanoma (Gao *et al.*, 2006).

Evidências indicam que a proteína RAP1GAP, um fator de inativação de RAP1, é expressa em menor quantidade em vários tipos de câncer. No câncer de tireóide a baixa regulação de RAP1GAP aparece como consequência de degradação proteossomal (Zuo *et al.*, 2010), no câncer pancreático e de tireóide papilar é devido à perda de heterozigosidade (Zhang *et al.*, 2006), no

câncer de melanoma e de tireóide devido à metilação do promotor (Zheng *et al.*, 2009; Zuo *et al.*, 2010) e no câncer de mama devido à mutações genéticas (Sjoblom *et al.*, 2006). Apesar de ser frequente a baixa expressão de RAP1GAP em tumores humanos, as consequências biológicas da diminuição da expressão desta proteína foram estudadas em apenas poucas linhagens de células cancerosas. Em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, RAP1GAP inibe o crescimento do tumor atrasando a transição de fase de G1/S no ciclo celular (Zhang *et al.*, 2006). RAP1GAP também inibe a atividade de cinases reguladas por sinal extracelular, a proliferação celular, a sobrevivência e a migração de células do melanoma (Zheng *et al.*, 2009). Estudos também demonstraram que a reintrodução de RAP1GAP em linhagens de células cancerosas, afetam algumas características das células transformadas. Por exemplo, a indução da superexpressão de RAP1GAP em linhagens celulares de carcinoma escamoso de orofaringe e pancreático (Zhang *et al.*, 2006) bloqueia a formação de tumores em modelos animais. A superexpressão *in vitro*, de RAP1GAP diminui a proliferação celular do tumor e favorece a apoptose (Zhang *et al.*, 2006; Tsygankova *et al.*, 2007; Mitra *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2009). Tais achados sugerem que as RAPGAP funcionam como supressoras de tumor.

A descoberta de que a proteína E6 dos HR-HPV atua na carcinogênese cervical através da degradação da GAP E6TP1 pela ubiquitina ligase E6AP, reforça a teoria de capacidade supressora de tumor das RAPGAP. Isso porque a E6TP1 apresenta um domínio catalítico de proteínas ativadoras da ligação do nucleotídeo guanina (GTPase) similar ao domínio catalítico da proteína RAP1GAP. A proteína E6 dos HR-HPV, promovendo a degradação da E6TP1, eleva os níveis de RAP1GTP, ativando RAP1 durante a transformação celular (Chakrabarti *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007).

A proteína E2 do HPV também parece estar envolvida na via de ativação de RAP1. E2 pode ligar ao DNA epissomal viral ao genoma do hospedeiro, por meio da interação com a proteína nuclear Brd4. Uma vez ligada à Brd4, a proteína E2 compete com a proteína SPA-1, uma RAPGAP. Ou seja, a ligação da proteína E2 a Brd4 pode favorecer disfunção da proteína SPA1, criando um estado hiperativo de RAP1 no citoplasma (D'Silva *et al.*, 2003; Farina *et al.*,

2003; Mitra *et al.*, 2003; McBride *et al.*, 2006; McPhillips *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007; Frische *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2010).

3.9.1 Proteína Rap1 como biomarcador do câncer cervical

A proteína RAP1 foi identificada e caracterizada como biomarcador da neoplasia cervical pelo nosso grupo de pesquisa com potencial utilização no auxílio ao diagnóstico deste câncer (Pascoal-Xavier, 2008; 2011; Pascoal-Xavier *et al.*, 2015 [em anexo]). Um estudo transversal foi realizado com biópsias cervicais para determinar a associação de RAP1 com a neoplasia intraepitelial cervical (NIC). A avaliação quantitativa e imuno-histoquímica de expressão RAP1 foram feitas em 183 amostras de tecido cervical, fixadas e embebidas, em parafina classificadas como mucosa normal ou não-displásicas (NDM) (n = 33); NIC grau 1 (n = 84) e NIC de grau 2/3 (n = 66). Um aumento gradual na expressão RAP1 nas amostras NDM <NIC 1 <NIC 2/3 ($p < 0,001$) foi observado de acordo com o diagnóstico histopatológico. Um aumento progressivo dos níveis de expressão de RAP1 aumentou em 3,5 vezes a chance de risco de NIC 1 [(OR) = 3,50; Intervalo de confiança (CI) 1,30-10,64] e a chance de risco de CIN2/3 em quase 20 vezes (OR = 19,86, CI 95%=6,40-70,79) quando comparadas a NDM. Além disso, a análise de regressão logística mostrou que este aumento progressivo da expressão de RAP1 impactou mais fortemente NIC 2/3 do que NIC 1. Portanto, os nossos resultados sugerem que RAP1 pode ser um biomarcador útil para o diagnóstico de NIC. Todavia, a expressão da proteína RAP1 em amostras cervicais provenientes de citologia em meio líquido (CBL) ainda não é conhecida.

4 POPULAÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estratégias de Trabalho

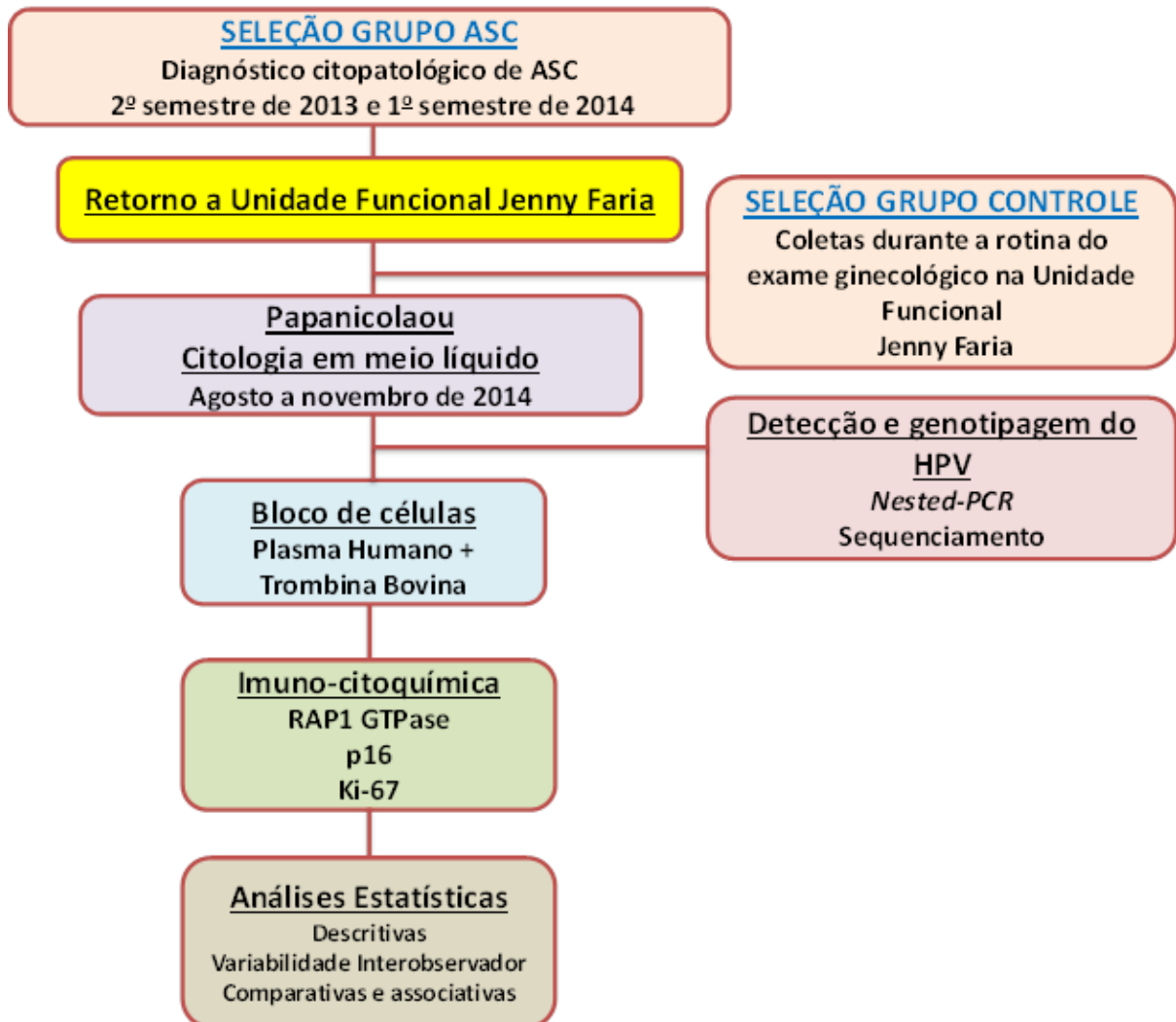


Figura 11 – Estratégias de trabalho.

4.2 Aspectos éticos

Este estudo transversal foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela Assembleia do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG e também obteve parecer favorável da Unidade Funcional Bias Fortes e Jenny Faria do Hospital das Clínicas da UFMG (em anexo).

4.3 Critérios de seleção das pacientes

Para compor o grupo ASC deste estudo foram selecionadas 96 pacientes, de acordo com conclusão do laudo do exame citopatológico prévio, realizado no segundo semestre de 2013 e primeiro semestre de 2014, pelo Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia do Hospital das Clínicas da UFMG, de acordo com o Sistema de Informações do Câncer do Colo Uterino (SISCOLO). A conclusão do laudo indicativa para o grupo ASC foi “Células atípicas de significado indeterminado possivelmente não neoplásico - ASC-US” e “Células atípicas de significado indeterminado não podendo se afastar lesão de alto grau – ASC-H”. Para coleta dos dados pessoais das 96 pacientes selecionadas, foi utilizada a base de dados NET-TERN da Unidade Funcional Jenny Faria. O recrutamento iniciou-se no contato telefônico, momento no qual foi explicada a proposta do projeto e se havia interesse da paciente em colaborar nesta pesquisa. A paciente foi convidada a retornar a Unidade Funcional Jenny Faria para nova coleta.

As amostras do grupo “controle”, que incluem alterações celulares benignas (reativas ou reparativas) foram coletadas durante a rotina do exame ginecológico na Unidade Funcional Jenny Faria do HC-UFMG, após as pacientes concordarem e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) [em anexo].

4.3.1 Critérios de inclusão das pacientes no estudo

Neste estudo foram incluídas as pacientes que preencheram todos os critérios de inclusão citados abaixo:

(a) concordância da paciente com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do estudo;

(b) retorno à Unidade Funcional Jenny Faria do HC-UFMG, no ano de 2014, para repetição do exame citopatológico em 6 meses, conforme recomendado pelas Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero, do INCA -MS (INCA, 2011);

(c) exames ginecológicos e especular do colo uterino, normais ou sem evidência de lesões intraepiteliais de baixo ou alto grau e de câncer invasor, durante atendimento ambulatorial na Unidade Funcional Jenny Faria do HC-UFMG, no ano de 2014.

4.3.2 Critérios de exclusão das pacientes do estudo

Os seguintes critérios de exclusão foram adotados:

(a) gestantes;

(b) pacientes com idade superior a 60 anos;

(c) pacientes imunocomprometidas ou com diagnóstico de infecção por HIV/AIDS.

4.4 Coleta e preservação das amostras

Conforme protocolo da pesquisa, foram coletadas amostras para citologia oncológica convencional (Teste de Papanicolaou) sendo as lâminas para citologia enviadas ao Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). Logo em seguida, foram coletadas novas amostras para citologia em meio líquido (CBL) utilizando-se o kit ThinPrep/PreservCyt (Cytic Corp.USA) que contém 20 mL de solução conservante/fixadora. Para a região ectocervical foi realizado o raspado celular com espátula de Ayre, e para a região endocervical foi utilizada escova do tipo Cytobrush (Kolplast Ltda). As amostras

devidamente identificadas com o nome da paciente e número de prontuário foram armazenadas e conservadas até seis semanas (máximo) a temperatura ambiente (Figura 12). Um volume de 10 mL da suspensão celular foi utilizado para preparação dos blocos de células para os ensaios imunocitoquímicos no Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (FM-UFMG) e os 10 mL restantes foram utilizados para os testes moleculares no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/Fiocruz Minas). Os testes moleculares foram realizados sem o conhecimento prévio dos resultados da citopatologia. As amostras cervicais foram coletadas pelas médicas residentes, Dra. Cecília de Souza Monteiro, Dra. Sabrina de Souza Alves e Dra. Brenda Peixoto Godinho.

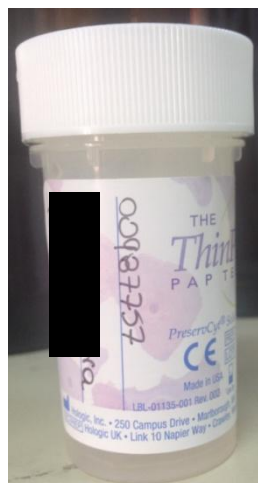


Figura 12 - Frasco para coleta de amostras cervicais para citologia em meio líquido. No momento da coleta todas as amostras foram identificadas com o nome e número de prontuário da paciente e armazenadas por até seis semanas a temperatura ambiente.

4.5 Métodos morfológicos

4.5.1 Cultivo celular

Células HeLa - Linhagem celular de ceratinócitos derivada de paciente com câncer cervical, que possui DNA de HPV-18 integrado ao genoma celular. O cultivo das células HeLa, foi feito utilizando-se meio de *Eagle* modificado por

Dulbecco (DMEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) [Cultilab, Campinas] contendo 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (Gibco BRL). As células foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Esta linhagem celular, gentilmente cedida pelo Dr. Cláudio Bonjardim do Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais, foi utilizada como controle positivo nos experimentos de imunocitoquímica, de detecção do DNA do HPV e de genotipagem do HPV detectado.

4.5.2 Preparação do bloco de células

A preparação do bloco de células (*cell block*), procedimento utilizado para obter uma alta concentração de células, foi realizado com o sedimento da amostra de citologia em meio líquido contida na solução ThinPrep Pap Test® PreservCyt (Hologic, Inc. Corporate, MA). Para tal, 10 mL da suspensão celular foram centrifugadas por 10 minutos a 400 x g a temperatura ambiente, em tubo Falcon de 50 mL (rotor 6441, centrífuga Sorvall RT Legend). Este tubo foi escolhido por apresentar maior diâmetro facilitando a manipulação do sedimento celular. O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e, em seguida, o sedimento de células foi ressuspensionado em 3 a 5 gotas de plasma humano. Imediatamente após, foram adicionados 25 a 75 µL de trombina (Thrombin from bovine plasma; Sigma-Aldrich, T7513-100UN), Após 5 a 10 minutos, a temperatura ambiente, ocorreu à formação do coágulo (adaptado de Keyhani-Rofagha & Vesey-Shecket, 2002), como ilustrado na Figura 13.

O coágulo contendo as células cervicais, devidamente identificado, foi envolvido em papel toalha e corado com eosina (E1007.01.AD, Synth) para melhor visualização de sua localização no bloco de parafina (Figura 14). Em seguida, o coágulo foi transferido para um cassete de histologia e armazenado em solução de formaldeído a 10% (Synth). As amostras foram processadas utilizando o processador de tecidos (modelo PT 05, LUPETEC®, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras foram banhadas em formaldeído a 10% por duas vezes, em álcool a 70%, álcool a 95% por duas vezes, álcool a 100%, acetato de butila, xilol por três vezes e,

finalmente, em parafina aquecida a 65°C por duas vezes. Todos os banhos duraram 1 hora cada. Posteriormente, os blocos celulares foram incluídos em parafina (Figura 13) [L: 108080, Synth].

A partir dos blocos de células parafinados, foram feitos cortes de 5 µm de espessura (Micrótomo Leica RM2125RT) e montados em lâminas para microscopia. As amostras foram desparafinadas e rehidratadas, com lavagens em xilol, por 20 minutos e em álcool etílico (PA), por 5 minutos, para coloração padrão com hematoxilina de Harris e eosina (HE). As lâminas coradas com HE foram utilizadas para avaliar a adequabilidade das amostras, o desempenho do bloco de células para o diagnóstico e a variabilidade interobservador. Posteriormente, novas lâminas contendo cortes de 5 µm de espessura das amostras foram confeccionadas para os ensaios imunocitoquímicos. Para os ensaios imunocitoquímicos foram utilizadas lâminas de vidro com carga positiva (Figura 14) [ImmunoSlide, cat. EP-51-30184, EasyPath].

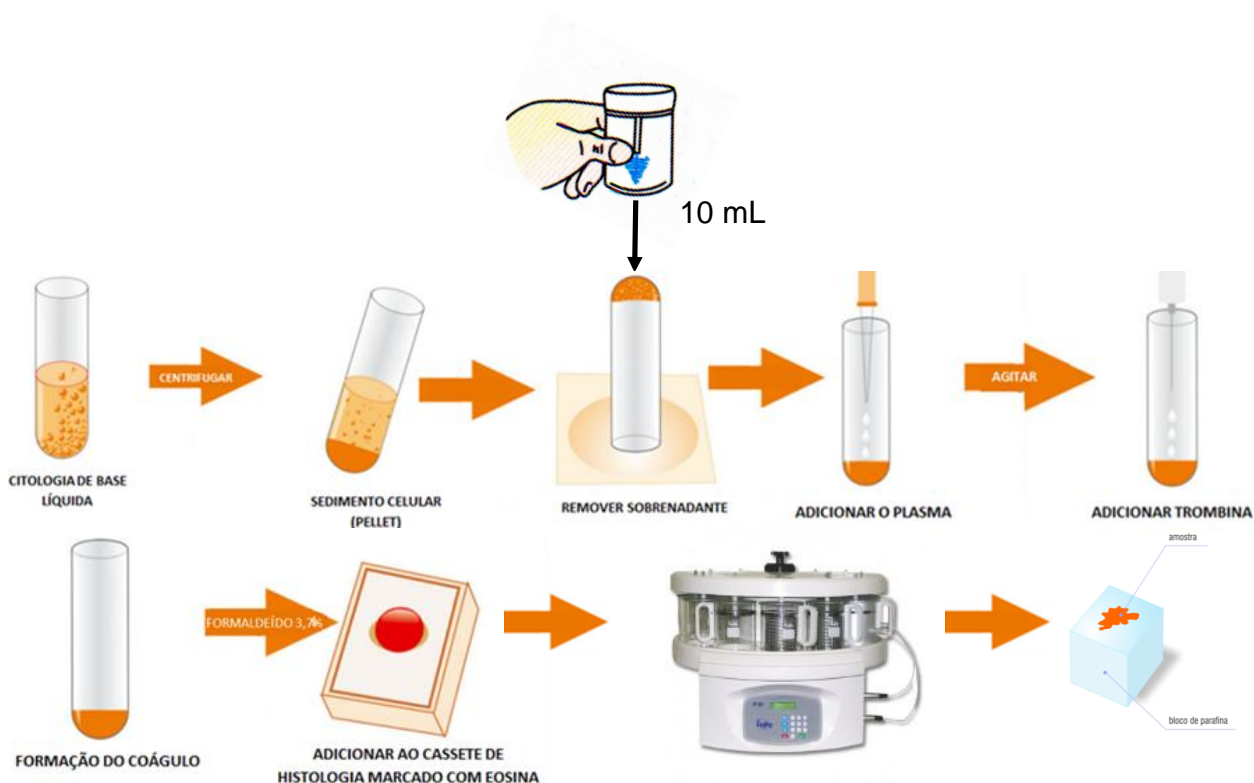


Figura 13 - Preparação do bloco de células (*cell block*) das amostras cervicais. O sedimento de amostras cervicais coletadas para citologia em meio líquido (CBL) foi adicionado de plasma humano e trombina para formação do coágulo foi processado como descrito no item 5.4.2. de Material e Métodos, para a análise citopatológica e para utilização nos ensaios de imunocitoquímica. Fonte: Adaptado de Jain *et al.*, 2014

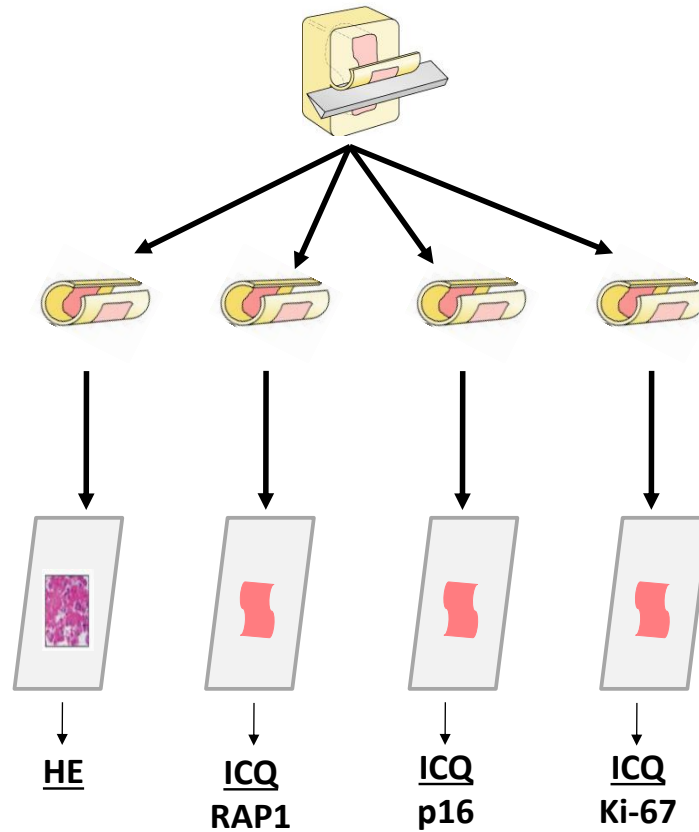


Figura 14 - Confeção de lâminas das amostras cervicais. A partir dos blocos de células parafinados foram feitos cortes de 5 µm de espessura para confecção de lâminas coradas por HE e para os ensaios imunocitoquímicos das proteínas RAP1, p16 e Ki-67. As lâminas coradas por HE foram utilizadas para verificar a adequabilidade das amostras, o desempenho do bloco de células para o diagnóstico e a variabilidade interobservador. Fonte: Adaptado de Pascoal-Xavier, 2011.



Figura 15 - Coágulo celular obtido para preparação de bloco de células. O coágulo, corado com eosina, contendo as células cervicais foi obtido como descrito no item 5.4.2 de Material e Métodos.

4.5.3 Ensaio imunocitoquímico

Para realização dos ensaios imunocitoquímicos, foi utilizado o kit *NovoLink Max Polymer Detection Novocastra™* (Leica Microsystems). As lâminas contendo os cortes seriados de 5 µm das amostras parafinadas foram incubadas por 18 horas, a 56°C, em estufa. Posteriormente, as amostras foram submetidas a etapas de desparafinização e rehidratação, com lavagens em xilol, por 20 minutos, em álcool etílico (PA), por 5 minutos. Após a rehidratação, foi realizada a recuperação antigênica, processo necessário para induzir a exposição dos antígenos, no qual as lâminas foram aquecidas em solução de citrato de sódio a 0,01 M (pH 6,0) a 90°C por 20 minutos no vapor e resfriadas a temperatura ambiente por 20 minutos.

A peroxidase endógena dos tecidos e as proteínas inespecíficas foram bloqueadas nas diferentes etapas utilizando-se as soluções específicas fornecidas pelo kit *NovoLink*. A coloração para imunocitoquímica foi feita separadamente com os seguintes anticorpos primários: anti-RAP1A (policlonal de coelho RAP1 121 SC-65, 200 µg/mL), anti-p16 (policlonal de coelho H-150 SC-759, 200 µg/mL), ambos da Santa Cruz Biotechnology, e o anticorpo monoclonal de camundongo (clone MIB-1) anti-Ki-67 humana (IR 626, Dako

Technologies Company). Vários testes foram realizados para verificação da concentração ideal dos anticorpos primários, incluindo diluições de anticorpos que variaram de 1:50 até 1:300 em diluente fornecido pelo kit *NovoLink*. A diluição 1:50 foi definida para todos os anticorpos primários utilizados neste estudo.

Assim, após a adição de 50 µL da diluição 1:50 dos anticorpos primários às lâminas, estas foram incubadas, em câmara úmida, por 1 hora, a temperatura ambiente. Em seguida foi feito o bloqueio por 30 minutos, utilizando a solução de bloqueio pós-primário específica do kit *NovoLink*. Os cortes foram incubados com o sistema universal de detecção por polímeros do kit *NovoLink* por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente, foram adicionados 200 µL da solução reveladora fornecida pelo kit contendo o cromógeno diamino-benzidina 3,3 (DAB) e a reação incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. A contra coloração foi realizada mergulhando as lâminas em solução de hematoxilina de Harris (Cód. 248, Vetec) por 30 segundos. As lâminas foram lavadas em água corrente por 2 minutos e, em seguida, lavadas 3 vezes em álcool etílico e 2 vezes em xilol para montagem com lamínulas.

As lâminas foram analisadas utilizando-se o microscópio óptico Olympus BX, conforme parâmetros do estudo, e digitalizadas no equipamento Panoramic Viewer (3DHISTECH Ltd). Blocos de células HeLa foram utilizados como controle positivo em todos os experimentos de imunocitoquímica.

4.5.4 Parâmetros citomorfológicos e imunocitoquímicos

Para análise da qualidade das amostras, da concordância entre os dois métodos (teste Papanicolaou e bloco celular) e da variabilidade interobservadores, foram adotados os seguintes parâmetros:

- (a) adequabilidade da amostra: satisfatória (presença de 10 ou mais células epiteliais escamosas por lâmina) ou insatisfatória (presença de menos de 10 células epiteliais escamosas por lâmina);
- (b) tamanho do núcleo (TN): normal ou aumentado;
- (c) relação núcleo/citoplasma: normal ou aumentada;

- (d) coloração nuclear: normal ou hipercromática;
- (e) forma do núcleo: normal ou irregular;
- (f) distribuição da cromatina: homogênea ou heterogênea.

Para análises semi-quantitativas das reações imunocitoquímicas dos anticorpos anti-RAP1, anti-p16 e anti-Ki-67, foram adotados os seguintes parâmetros:

(a) percentagem de células positivas menor que 10% ou maior que 10% de células com coloração positiva para RAP1 e p16;

(b) percentagem de células positivas menor que 1% ou maior que 1% de células com coloração positiva para Ki-67;

(c) localização da imunomarcação: ausente, somente citoplasma, somente núcleo, somente membrana citoplasmática, citoplasma e núcleo, todos os compartimentos;

(d) intensidade da coloração: classificada subjetivamente como 0, 1+, 2+, ou 3+ e agrupados em duas categorias: (i) fraco = 0 ou 1+ que foi considerado como negativo; (ii) forte = 2+ ou 3+, considerado como positivo.

4.5.4.1 Variabilidade interobservador

A fim de verificar a concordância do diagnóstico utilizando o bloco celular, três patologistas da FM-UFMG com experiência em patologia do trato genital e que rotineiramente fazem diagnósticos anatomopatológicos, examinaram as lâminas, coradas com hematoxilina-eosina, de forma independente e “cega”, ou seja, sem o conhecimento do diagnóstico elaborado pelo colega e sem o conhecimento do diagnóstico obtido no teste de Papanicolaou (padrão).

4.6 Métodos moleculares

4.6.1 Extração de DNA

Para a obtenção do DNA genômico das amostras citológicas foi utilizado o kit QIAamp DNA Mini Kit (Cat. No. 51304 - Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Para tal, os 10 mL restantes das amostras CBL foram

transferidos para tubo Falcon de 15 mL, e centrifugados 400 x g (centrífuga Sorvall Legend RT; rotor 6441) por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado cuidadosamente e mantido o sedimento (*pellet*). O sedimento de células foi ressuspenso em 200 µL de PBS e a suspensão celular transferida para tubo de 1,5 mL contendo 20 µL de proteinase K (fornecida pelo kit). A mistura foi homogeneizada e incubada a 56°C por 10 minutos a temperatura ambiente. Após, foram adicionados 200 µL de etanol a 96-100% (Merck) e a mistura transferida para a coluna *QIAamp Mini spin column*. Seguiram-se as etapas de lavagem, e ao final o DNA foi eluído em 200 µL do tampão de eluição AE. A concentração de DNA purificado foi medida no comprimento de onda de 260 nm em espectrofotômetro Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific, USA). As amostras de DNA purificado foram armazenadas a -20°C.

4.6.2 Verificação da presença de inibidores da PCR nas amostras cervicais e da integridade do DNA extraído

O DNA extraído das amostras cervicais foi submetido a PCR para amplificação do gene da beta globina humana para o controle da presença de inibidores da PCR nas preparações e da integridade do DNA extraído. Para tal, foram utilizados os iniciadores PCO3 (5'-ACACAACACTGTGTTCACTAGC-3' e PCO4 (5'- CAACTTCATCCACGTTCCACC - 3') (Saiki *et al.*, 1988), que geram um produto de 110 pares de base (pb).

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

A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, pareamento a 53°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Para verificação da amplificação do fragmento do gene da beta globina, 5 µL do produto da PCR foram adicionados a 1 µL de tampão de amostra 6 X

(azul de bromofenol a 0,25%; xilenocianol a 0,25%; Ficoll 400 a 15% em 5 X TBE) e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% em tampão TBE 1 X (Tris-Borato-EDTA) a uma voltagem constante de 100 V por cerca de 30 a 40 minutos. Após, o gel foi corado com nitrato de prata de acordo com Sanguineti e colaboradores (1994) com modificações.

4.6.3 Detecção do DNA do HPV pela *nested-PCR*

A detecção do DNA de HPV nas amostras cervicais foi feita por *nested-PCR*, sendo primeiramente, o fragmento do gene L1 amplificado com os iniciadores consensos MY09 e MY11 que pareiam a uma região conservada do gene L1 dos HPV tipo 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, IS39, CP8304, CP6108, MM4, MM7, MM8, que infectam a mucosa genital, gerando um produto de 450 pares de base (pb). Na sequência dos iniciadores MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGTC-3') e MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'), M corresponde às bases A/C, W às bases A/T e R às bases A/G (Gravitt *et al.*, 2000). Na reação para amplificação do fragmento 450 pb com os iniciadores MY11 e MY09 foram utilizados 10 µL de DNA extraído; 2 µL de tampão STR 10X Promega (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 1% Triton X-100 e 2 mM dNTP); 0,3 µL de Gold Taq polimerase (Promega; 5 U/µL); 1 µL do iniciador senso (10µM); 1 µL de iniciador anti-senso (10 µM) e H₂O até o volume final de 20 µL. A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, pareamento a 53°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; seguidos de um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade e especificidade na detecção do genoma de HPV nas amostras cervicais, o amplificado da primeira reação foi submetido a uma segunda reação com par de iniciadores GP5+ (5' TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC 3') e GP6+ (5' GAAAATAAACTGTAAATCATATTC 3') que amplificam um fragmento de 150 pb internos ao fragmento de 450 pb amplificado na primeira reação (Zehbe & Wilander, 1996; Husnjak *et al.*, 2000; Fuessel-Haws *et al.*, 2004). Como

controle positivo da reação de amplificação foi utilizado o DNA extraído da linhagem celular HeLa. Na segunda reação (*nested*) feita com os iniciadores GP5+ e GP6+ para amplificação do fragmento 150 pb foram utilizados 10 µL do produto da primeira PCR; 4 µL de tampão STR 10 X Promega (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 1% Triton X-100 e 2 mM dNTP); 0,6 µL de Gold Taq polimerase (Promega; 5 U/µL); 2 µL do iniciador senso (10 µM); 2 µL de iniciador anti-senso (10 µM) e H₂O até o volume final de 50 µL. A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 minuto, pareamento a 40°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Para verificação da banda de interesse (150 pb), 5 uL do produto da PCR foram submetidos à eletroforese em gel analítico de poliacrilamida a 8% (como descrito no item 5.5.2). Os 45 uL restantes foram submetidos à eletroforese em gel preparativo de agarose a 2% para excisão e purificação do DNA da banda de interesse para a genotipagem de HPV pelo sequenciamento automático de DNA como descrito no item 5.5.4.

4.6.4 Genotipagem do HPV por sequenciamento automático

Para a purificação da banda de 150 pb do gene L1, amplificado a partir das amostras cervicais pela *nested*-PCR, 45 uL da reação foram acrescidas de tampão de amostra de 6X Loading Dye (Fermentas) e fracionadas por eletroforese preparativa em gel preparativo de agarose a 2% em tampão TAE 0,5X. A corrida foi feita em cuba para eletroforese horizontal (MUPID Exu, Advance, Japão) contendo um volume apropriado de TAE 0,5X, a 100 V. Para a visualização do DNA fracionado sob a luz UV, o corante fluorescente de ácidos nucleicos GelRed® (Biotium, USA) foi adicionado ao gel de agarose e também ao tampão de corrida na concentração indicada pelo fabricante. O gel contendo os fragmentos de DNA foi visualizado e fotografado sob luz ultravioleta (UV) no aparato ImageQuant LAS 4000 series (GE Healthcare Life Sciences). A banda de 150 pb foi recortada do gel com o auxílio de bisturi, para extração de DNA pelo Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), de acordo com as

instruções do fabricante. O DNA purificado foi quantificado em espectrômetro Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific).

A reação de sequenciamento de ambas as fitas do DNA do fragmento do gene L1 foi realizada em placa de 96 poços (N801-0560 MicroAmp 96-well Reaction plate, Applied Biosystems) em termociclador Applied Biosystems® GeneAmp Thermal Cycler 9700, (Life Technologies), utilizando-se o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems®, Life Technologies) adicionando-se 20 a 30 ng do produto de PCR de 150 pb purificado. Inicialmente, as amostras foram aquecidas a 96°C por um minuto para desnaturação das fitas e, após, submetidas por 35 ciclos de 96°C por 15 segundos para desnaturação; 50°C por 15 segundos para pareamento do iniciador, 60°C por 4 minutos para extensão. Após, as reações de sequenciamento foram submetidas a um processo de precipitação para eliminação dos iniciadores e dos dideoxinucléotídeos marcados com fluorocromos não utilizados na reação, sendo o DNA precipitado desnaturado pela adição de 10 uL/poço de formamida.

A corrida foi feita no sequenciador da empresa Myleus Biotechnology, em sequenciador automático capilar ABI 3130 (Life Technologies). Para análise dos cromatogramas foi utilizado o software Sequence Scanner Software (Applied Biosystems) disponível no link (<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=600583&tab=DetailInfo>). As sequências nucleotídicas foram analisadas pelo programa BLAST N (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.7 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas do estudo foram utilizados os programas MINITAB 16 (Minitab Inc., State College, Pennsylvania) e R (Version 2.15.3; <http://www.r-project.org>). No R, foi utilizado o pacote ROC.

Os testes estatísticos, selecionados de acordo com os objetivos descritos, foram feitos pelo Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier (Figura 16).

Objetivo	Método(s) estatístico(s)	Característica
Comparações entre grupos	Qui-quadrado, Teste t e Mann-Whitney	Significância estatística: $p < 0,05$
Correlação entre grupos	Pearson	Significância estatística: $p < 0,05$
Variabilidade entre observadores	Kappa	Valores do Kappa e concordância: <0 = nula; 0–39 = pobre; 40-59 = moderada; 60-79 = ótima; 80-100 = excelente concordância.
Relação entre variáveis categóricas	Regressão logística	Medida de associação: Odds ratio (OR)

Figura 16 - Testes estatísticos utilizados nesse estudo.

5 RESULTADOS

5.1 Seleção das pacientes

Para este estudo foram selecionadas 96 pacientes para o grupo “Atipia em células escamosas – ASC”, de acordo com conclusão do laudo do exame citopatológico prévio, realizado no segundo semestre de 2013 e primeiro semestre de 2014. Destas, 64 pacientes foram excluídas por não conseguirmos contato telefônico, muitas vezes por causa de dados desatualizados ou inexistentes da base de dados (NET-TERN) da Unidade Funcional Jenny Faria do HC-UFMG. Portanto, 32 pacientes concordaram em participar e foram convidadas a retornar a Unidade Funcional Jenny Faria para nova coleta. Destas, 5 pacientes não compareceram e 2 foram excluídas por apresentarem carcinoma de células escamosas (CCE).

Para o grupo “Controle” constituído por pacientes com alterações celulares benignas reativas ou reparativas (negativo para neoplasia) foram selecionadas 24 pacientes durante a rotina do exame ginecológico na Unidade Funcional Jenny Faria do HC-UFMG. Entretanto, 14 pacientes foram excluídas

do estudo porque não foram obtidas células suficientes para preparo do bloco celular (Figura 17).

Em suma, foram inseridas neste estudo 35 pacientes, que foram subdivididas nos grupos “Controle” e “ASC”. Dez pacientes, com idade média de 42 anos, formaram o grupo “Controle” e 25 pacientes, com idade média de 40 anos, integraram o grupo “ASC” (ASC-US e ASC-H). Todas as pacientes são procedentes do município de Belo Horizonte ou da região metropolitana de Belo Horizonte.

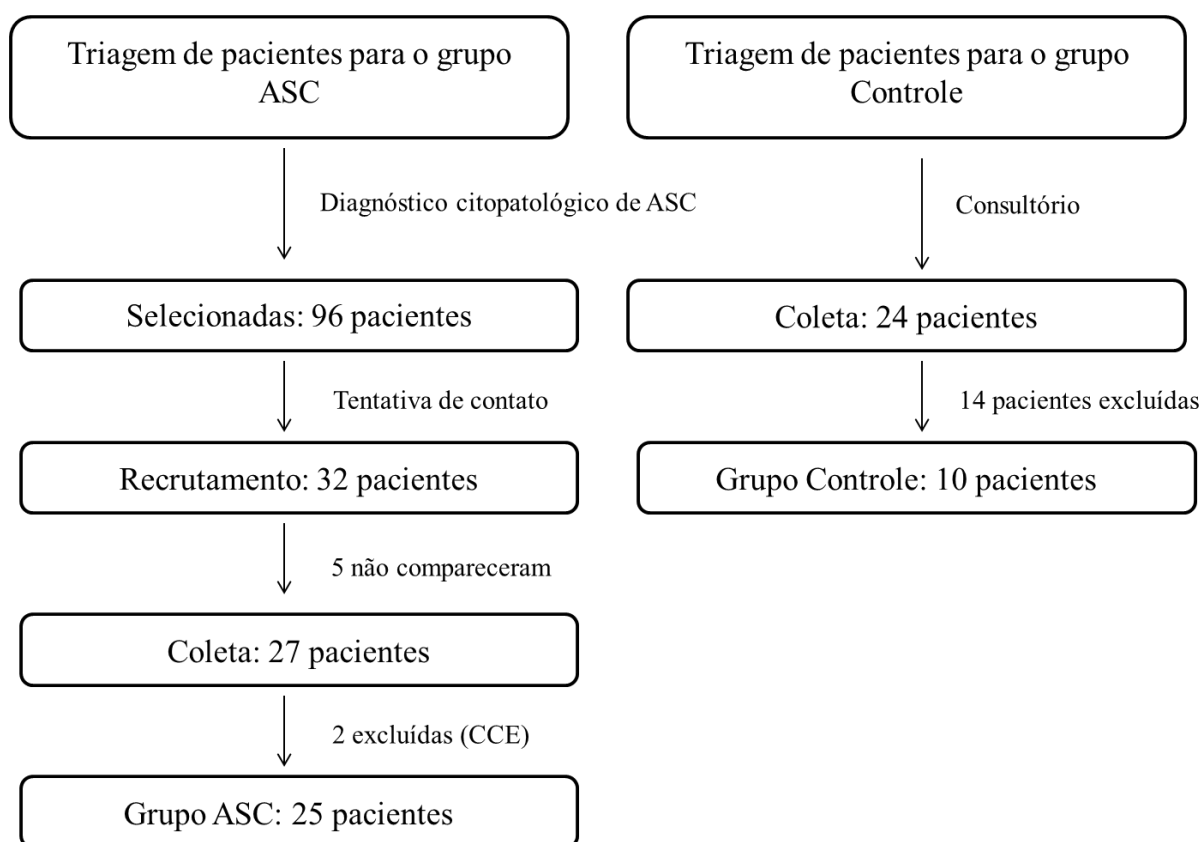


Figura 17 - Fluxograma de seleção/triagem de pacientes para inclusão nos grupos ASC e Controle desse estudo.

5.2 Teste de Papanicolaou

Conforme desenho do estudo, no retorno ambulatorial, foram coletadas amostras para citologia oncótica convencional (Teste de Papanicolaou), e logo em seguida, foram coletadas novas amostras para citologia em meio líquido, com o kit ThinPrep/PreservCyt (Cytic Corp.USA).

Os resultados dos testes de Papanicolaou das pacientes estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados do teste de Papanicolaou das pacientes do estudo

Diagnóstico¹/Grupo	“Controle” (%)	“ASC” (%)	Total (%)
Alterações benignas	08 (80,00)	19 (76,00)	27 (77,14)
ASC-US	01 (10,00)	4 (16,00)	5 (14,29)
ASC-H	01 (10,00)	1 (4,00)	2 (5,71)
LSIL	0	0	0
HSIL	0	1 (4,00)	1 (2,86)
CA	0	0	0
Total	10 (100,00)	25 (100,00)	35 (100,00)

1 – Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais e Condutas Preconizadas (INCA, 2006).

ASC: amostras classificadas como ASC-US ou ASC-H.

Considerando os critérios de inclusão do estudo, no seu intervalo de desenvolvimento, particularmente o exame especular do colo uterino normal, os resultados demonstraram que, no grupo controle (n=10), uma paciente progrediu para o diagnóstico ASC-US e outra para ASC-H. As demais pacientes permaneceram com diagnóstico de alterações benignas, permanecendo no grupo “Controle”.

Já no grupo ASC, 4 pacientes foram diagnosticadas como ASC-US e 1 paciente com ASC-H. Entretanto, 19 das 25 pacientes selecionadas com ASC na etapa de triagem apresentaram somente lesões benignas, e, portanto, foram reposicionadas para o grupo “Controle”. Outra paciente progrediu para lesão intraepitelial escamosa de alto grau (LIEAG) e foi excluída por não fazer parte dos objetivos deste estudo.

Os resultados do Teste de Papanicolaou nas pacientes selecionadas permitiram a inclusão das pacientes em dois novos grupos: o grupo “ACB”, constituído pelas 27 pacientes com diagnóstico de alterações celulares benignas e o grupo “ASC” pelas 7 pacientes com diagnóstico de atipias celulares epiteliais. Portanto, todas as comparações e análises definidas nos objetivos consideraram esse reagrupamento (“ACB”x “ASC”).

5.3 Adequabilidade da amostra de bloco de células

A coleta de uma amostra celular adequada é um pré-requisito para alcançar uma interpretação citológica que indique, de forma confiável, a existência de uma patologia. A análise dos blocos de células, corados pela hematoxilina e eosina (HE), no que diz respeito à adequabilidade das amostras, está sumarizada na Tabela 2.

Neste estudo foram consideradas como amostra satisfatória aquela que apresentou 10 ou mais células epiteliais escamosas por lâmina, e como insatisfatória aquela que apresentou menos de 10 células epiteliais escamosas por lâmina. Vale ressaltar que a classificação de uma amostra como insatisfatória indica que a amostra não é confiável para a detecção de anormalidades epiteliais cervicais e, portanto, na rotina clínica seria recomendável que nova amostra fosse coletada da paciente em questão. Entretanto, mesmo as amostras classificadas como insatisfatórias são analisadas pelo patologista na rotina clínica. Portanto, todas as 34 amostras cervicais foram analisadas em nosso estudo.

Tabela 2 - Adequabilidade das amostras de blocos celulares

Condição/Grupo	“ACB” (%)	“ASC” (%)	Total (%)
Satisfatória	23 (85)	06 (86)	29 (85)
Insatisfatória	04 (15)	01 (14)	05 (15)
Total	27 (100)	07(100)	34 (100)

ASC: amostras classificadas como ASC-US ou ASC-H; “ACB”: amostras com alterações celulares benignas.

Dentre o grupo “ACB”, 04 amostras (15%) foram classificadas como insatisfatórias. Apenas 01 amostra do grupo “ASC” apresentou menos de 10 células na preparação e foi classificada como insatisfatória. Assim sendo, 85% das amostras dos blocos de células foram consideradas satisfatórias para análise morfológica (Figura 18).

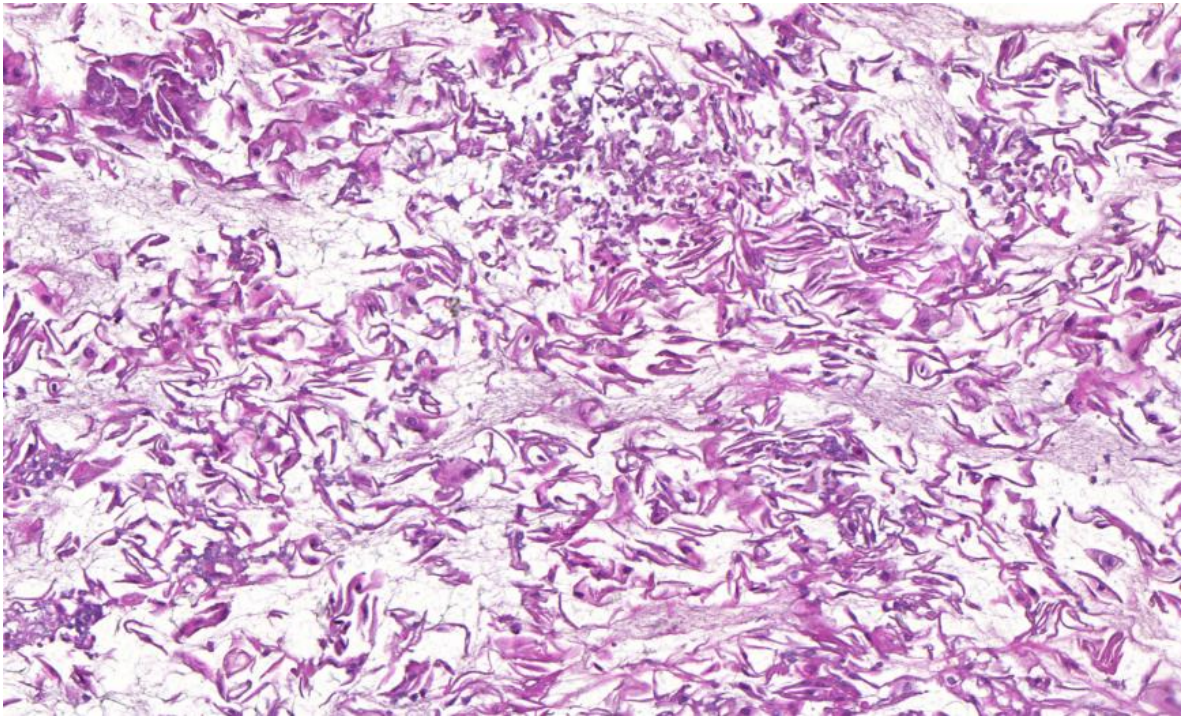


Figura 18 - Amostra de bloco de células classificada como satisfatória. Bloco de células (obtido como descrito no item 5.4.2. de Material e Métodos) apresentando agrupamento de células escamosas com quantidade superior a 10 células por lâmina. Coloração feita com hematoxilina/eosina. Aumento de 20X.

5.4 Desempenho do método bloco de células para o diagnóstico

Os principais parâmetros citopatológicos utilizados para o exame dos blocos de células (figura 19 a 22) foram os mesmos avaliados nos esfregaços celulares provenientes do colo uterino para o Teste de Papanicolaou.

Os seguintes parâmetros, recomendados pela Classificação Citopatológica Brasileira (INCA, 2006), com suas respectivas categorizações, foram utilizados:

- (a) tamanho do núcleo (TN), sendo 0 = inalterado; 1 = aumentado (cariomegalia);
- (b) relação núcleo-citoplasma (RCN), sendo 0 = inalterada; 1= reduzida;
- (c) coloração do núcleo (COLN), sendo 0 = normocrômico; 1 = hiperocrômico;
- (d) forma do núcleo (FORMA), sendo 0 = arredondada; 1 = irregular;

(e) distribuição da cromatina (CROMA), sendo 0 = homogênea; 1 = heterogênea.

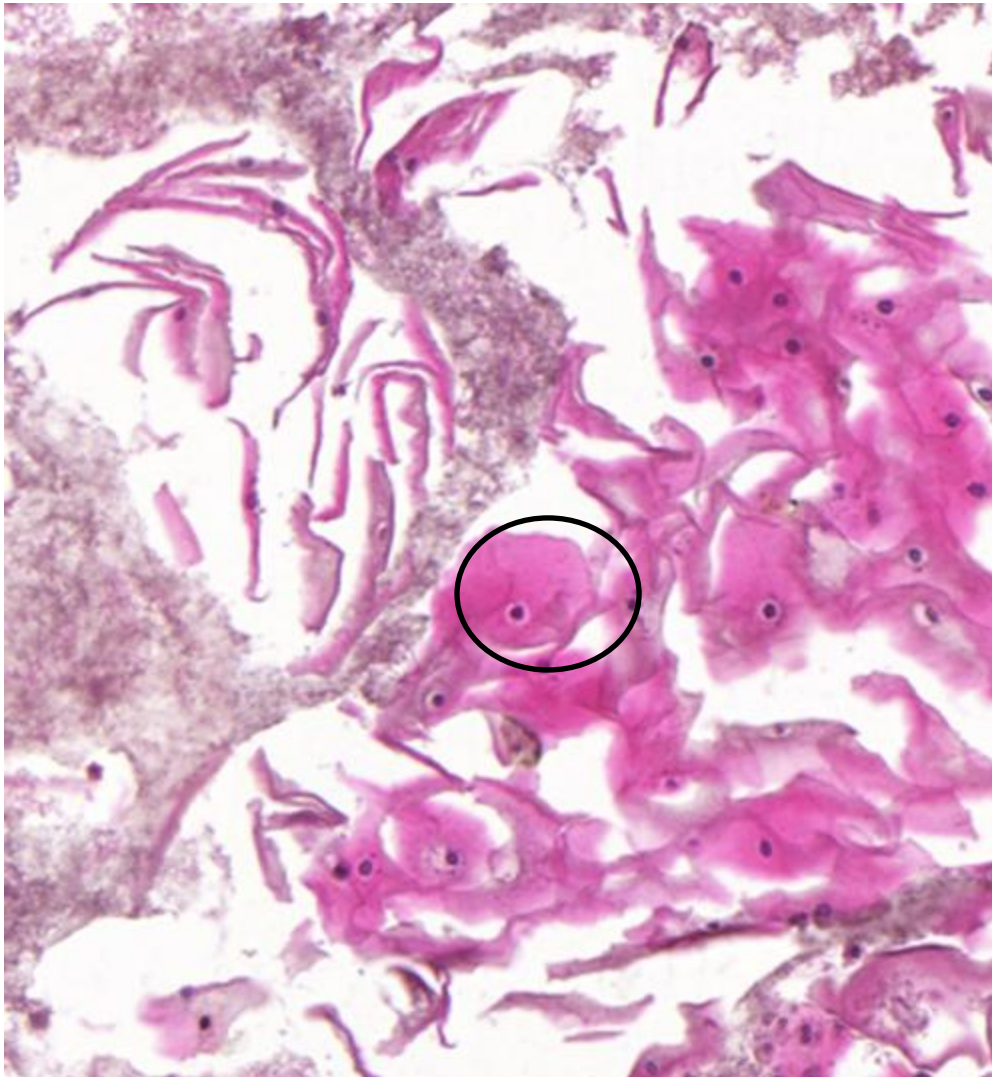


Figura 19 - Representação dos principais parâmetros citopatológicos avaliados nos blocos de células. Agrupamento de células escamosas superficiais reativas apresentando núcleos arredondados. Coloração feita com hematoxilina e eosina. Aumento de 20 X.

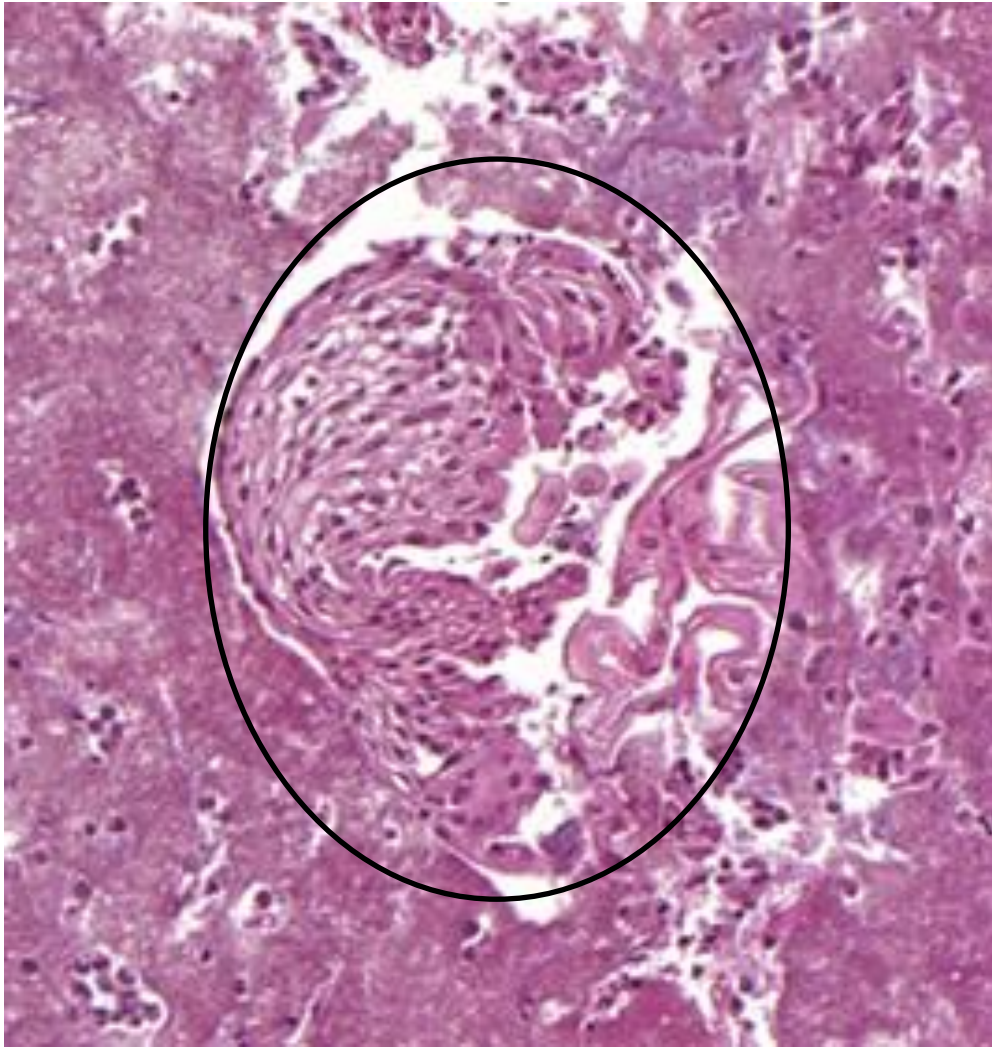


Figura 20 - Representação dos principais parâmetros citopatológicos avaliados nos blocos de células. Agrupamento de células escamosas mimetizando um fragmento de epitélio escamoso apresentando alterações de maturação e ceratinócios com cariomegalia. Coloração feita com hematoxilina e eosina. Aumento de 20 X.

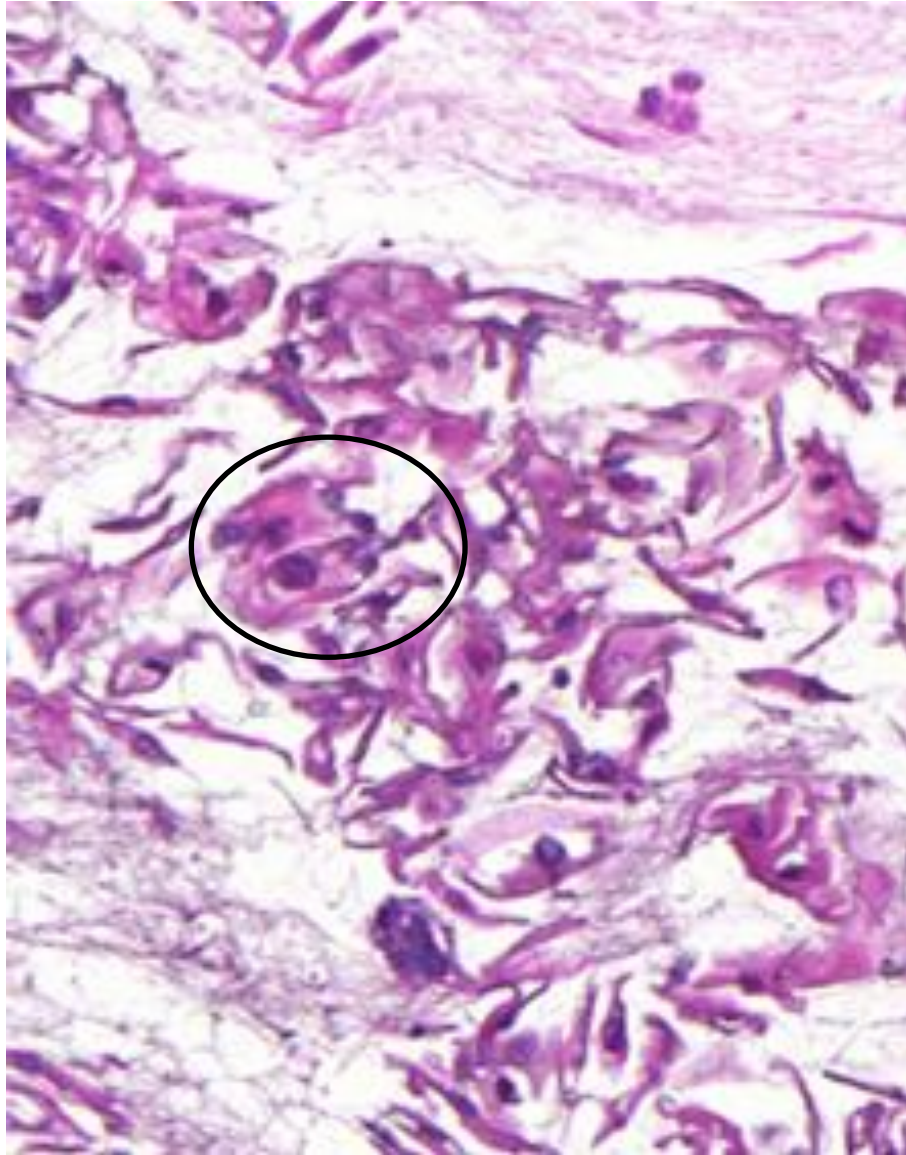


Figura 21 - Representação dos principais parâmetros citopatológicos avaliados nos blocos de células. Agrupamentos de células escamosas apresentando cariomegalia, aumento da relação núcleo/citoplasma, núcleo hipercrômico e distribuição irregular da cromatina. Coloração feita com hematoxilina e eosina. Aumento de 20 X.

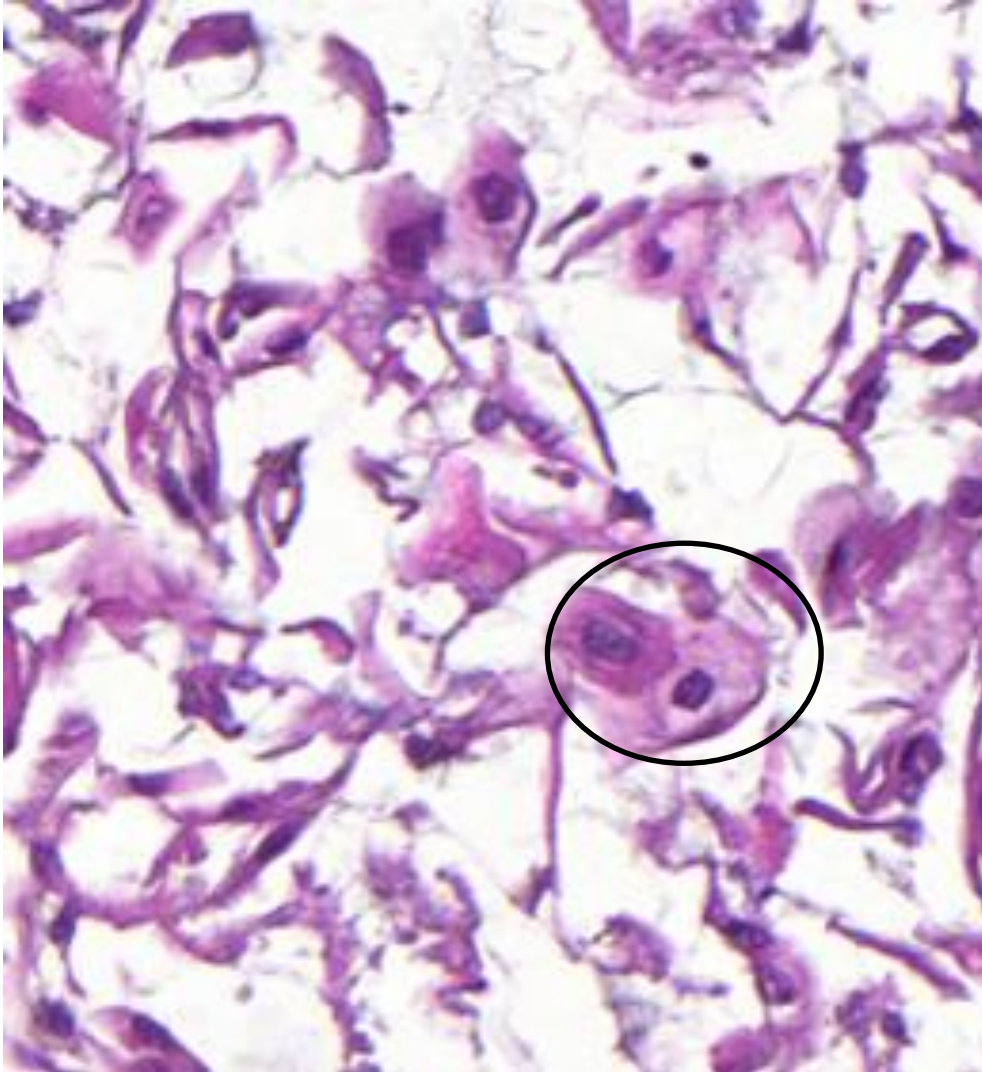


Figura 22 - Representação dos principais parâmetros citopatológicos avaliados nos blocos de células. Agrupamentos de células escamosas apresentando cariomegalia, aumento da relação núcleo/citoplasma, núcleo hiperocrômico e distribuição irregular da cromatina. Coloração feita com hematoxilina e eosina. Aumento de 20 X.

Considerando o diagnóstico citopatológico convencional (exame de Papanicolaou) como padrão, a tabela 3 sumariza os resultados da avaliação dos blocos celulares dos grupos “ACB”, contendo as 27 pacientes com conclusão diagnóstica de “Alterações celulares benignas reativas ou reparativas - Negativo para neoplasia”, e do grupo “ASC”, contendo as 7 pacientes com conclusões diagnósticas de “ASC-US” e “ASC-H”.

Tabela 3. Avaliação de parâmetros citopatológicos nas amostras de blocos de células

Parâmetro	Grupo "ACB"		Total (%)	Grupo "ASC"		Total (%)
	0 (%)	1 (%)		0 (%)	1 (%)	
TN	7 (25,93)	20 (74,07)	27 (100,00)	2 (28,57)	5 (71,43)	7 (100,00)
RCN	7 (25,93)	20 (74,07)	27 (100,00)	2 (28,57)	5 (71,43)	7 (100,00)
COLN	8 (29,63)	19 (70,37)	27 (100,00)	2 (28,57)	5 (71,43)	7 (100,00)
FORMA	11 (40,74)	16 (59,26)	27 (100,00)	2 (28,57)	5 (71,43)	7 (100,00)
CROMA	7 (25,93)	20 (74,07)	27 (100,00)	2 (28,57)	5 (71,43)	7 (100,00)

"ACB": amostras com alterações celulares benignas. ASC: amostras classificadas como ASC-US ou ASC-H. Tamanho do núcleo (TN) sendo 0 = inalterado, 1 = aumentado; relação núcleo-citoplasma (RCN) sendo 0 = inalterada, 1 = reduzida; coloração do núcleo (COLN) sendo 0 = normocrômico, 1 = hiperocrômico; forma do núcleo (FORMA) sendo 0 = arredondada, 1 = irregular; distribuição da cromatina (CROMA) sendo 0 = homogênea, 1 = heterogênea.

Esses resultados demonstraram que o exame dos principais parâmetros citopatológicos da citologia convencional são bem reproduzidos no exame dos blocos de células. Observam-se, tanto no grupo "ACB", assim como no grupo "ASC", a predominância de células com cariomegalia, o aumento da relação núcleo/citoplasma, hipercromasia, irregularidades da forma nuclear e distribuição heterogênea da cromatina.

Quando se compara o diagnóstico final obtido pelo exame dos blocos de células com o diagnóstico citopatológico convencional padrão (teste Papanicolaou) os resultados do desempenho dos blocos celulares em relação ao diagnóstico do grupo "ACB" e "ASC" demonstram sensibilidade de 38,46%, especificidade de 90,47%, valor preditivo positivo (VPP) de 71,42% e valor preditivo negativo (VPN) de 29,62% (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados do exame dos blocos de células e do teste de Papanicolaou (citologia)

Citologia	Blocos de Células		Total
	Grupo "ASC"	Grupo "ACB"	
Grupo "ASC"	5	2	7
Grupo "ACB"	8	19	27
Total	13	21	34

"ACB": amostras com alterações celulares benignas. ASC: amostras classificadas como ASC-US ou ASC-H.

Graficamente, o resultado do desempenho dos blocos de células em relação ao diagnóstico dos grupos "ACB" e "ASC", em relação ao teste Papanicolaou (citologia), está representado na curva ROC na Figura 23.

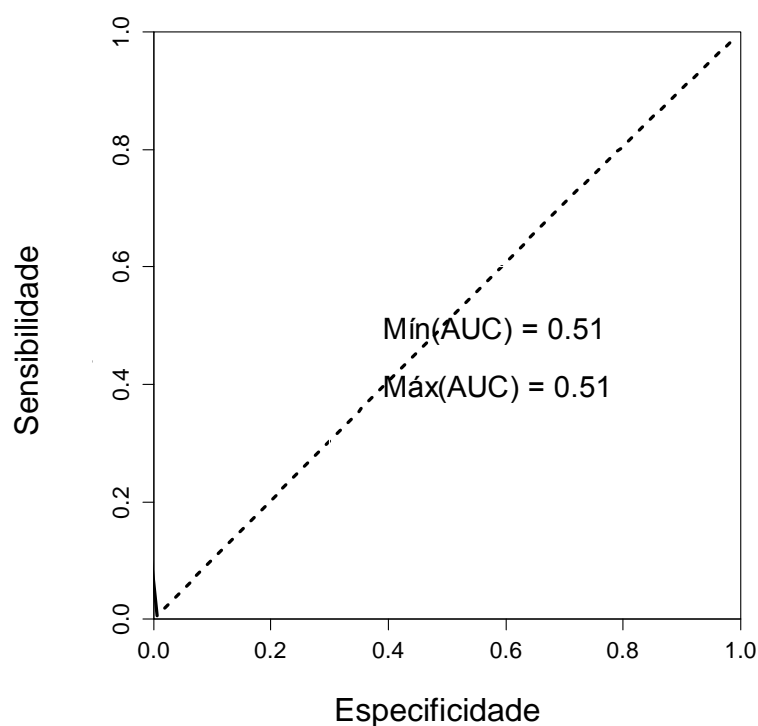


Figura 23 - Curva ROC dos resultados do exame dos blocos de células em relação ao teste de Papanicolaou.

Os resultados demonstram ótima especificidade (90,47%) e bom valor preditivo positivo (71,42%) do exame dos blocos de células. Entretanto, a sensibilidade (38,46%), o valor preditivo negativo (29,62%) e a área sob a curva ROC (AUC = 0,51) demonstraram baixos valores para a aplicabilidade dos blocos de células na triagem do câncer do colo do útero.

5.5 Variabilidade interobservador no diagnóstico dos blocos de células

A análise da variabilidade interobservador no diagnóstico citopatológico dos blocos de células, corados pela hematoxilina e eosina (HE), foi subdividida nos grupos “ACB” e “ASC”. Para cada grupo foram analisadas as concordâncias de cada observador versus o resultado do teste de Papanicolaou (padrão), as concordâncias entre observadores e a concordância de todos os observadores versus o teste de Papanicolaou, de acordo com as respostas: 0 = Alterações benignas; 1 = ASC-US; 2 = ASC-H; 3 = LIEBG; 4 = LIEAG.

Em relação ao grupo “ACB”, as análises das concordâncias de cada observador versus o teste de Papanicolaou padrão estão sintetizadas na Tabela 5.

Observa-se que a concordância foi nula ($Kappa = < 0$) entre cada observador versus o teste de Papanicolaou em relação ao grupo “ACB”, no diagnóstico de todos os tipos de lesões.

Tabela 5. Análise das concordâncias do diagnóstico dos blocos de células dos observadores denominados 1, 2 e 3 versus o teste de Papanicolaou em relação ao grupo “ACB”

Observador	Resposta	Kappa	DP ¹ Kappa	Z	p valor
1	0	-0,54	0,19	-2,82	1,00
	1	-0,28	0,19	-1,48	0,93
	2	*	*	*	*
	3	-0,15	0,19	-0,77	0,78
	4	*	*	*	*
	Global	-0,37	0,14	-2,53	1,00
2	0	-0,63	0,20	-3,30	1,00
	1	-0,17	0,20	-0,90	0,81
	2	-0,08	0,20	-0,41	0,66
	3	-0,20	0,20	-1,03	0,85
	4	*	*	*	*
	Global	-0,36	0,12	-2,87	1,00
3	0	-0,54	0,20	-2,82	1,00
	1	-0,14	0,20	-0,77	0,78
	2	-0,02	0,20	-0,10	0,54
	3	-0,22	0,20	-1,18	0,88
	4	-0,01	0,20	-0,10	0,54
	Global	-0,33	0,13	-2,50	1,00

¹ DP: Desvio padrão; * Ausência de resposta. 0 = Alterações benignas; 1 = ASC-US; 2 = ASC-H; 3 = LIEBG; 4 = LIEAG. “ACB” = amostras com alterações celulares benignas

A análise da concordância entre observadores está sintetizada na Tabela 6. Observa-se que a concordância entre os observadores foi pobre ou nula em todos os diagnósticos em relação ao grupo “ACB”. Sendo nula na concordância do diagnóstico de alterações benignas (Kappa= -0,06), ASC-US (Kappa= - 0,11) e LIEAG (Kappa= - 0,01). Já para o diagnóstico de ASC-H e LIEBG observa-se uma concordância pobre com valores de Kappa de 0,14 e 0,10, respectivamente.

Tabela 6 - Análise da concordância do diagnóstico dos blocos de células entre os observadores 1, 2 e 3 em relação ao grupo “ACB”

Resposta	Kappa	DP ¹ Kappa	Z	p valor
0	-0,06	0,11	-0,54	0,70
1	-0,11	0,11	-1,00	0,84
2	0,14	0,11	1,32	0,10
3	0,10	0,11	0,84	0,20
4	-0,01	0,11	-0,11	0,54
Global	-0,01	0,06	-0,16	0,56

¹ DP: Desvio padrão. 0 = Alterações benignas; 1 = ASC-US; 2 = ASC-H; 3 = LIEBG; 4 = LIEAG. “ACB” = amostras com alterações celulares benignas

A análise da concordância de todos os observadores versus o teste de Papanicolaou está representada na Tabela 7. Novamente observa-se que a concordância de todos os observadores versus o teste de Papanicolaou foram nulas para o diagnóstico de alterações benignas, ASC-US e LIEBG em relação ao grupo “ACB”.

Tabela 7 - Análise da concordância do diagnóstico dos blocos de células de todos os observadores versus o teste de Papanicolaou em relação ao grupo “ACB”

Resposta	Kappa	DP ¹ Kappa	Z	p valor
0	-0,57	0,11	-5,16	1,00
1	-0,20	0,11	-1,82	1,00
2	*	*	*	*
3	-0,20	0,11	-1,72	0,95
4	*	*	*	*
Global	-0,35	0,07	-4,54	1,00

¹ DP: Desvio padrão; * Ausência de resposta. 0 = Alterações benignas; 1 = ASC-US; 2 = ASC-H; 3 = LIEBG; 4 = LIEAG. “ACB” = amostras com alterações celulares benignas

A análise global da concordância de todos os observadores versus o teste de Papanicolaou, em relação ao grupo “ACB”, também está representada na Figura 24.

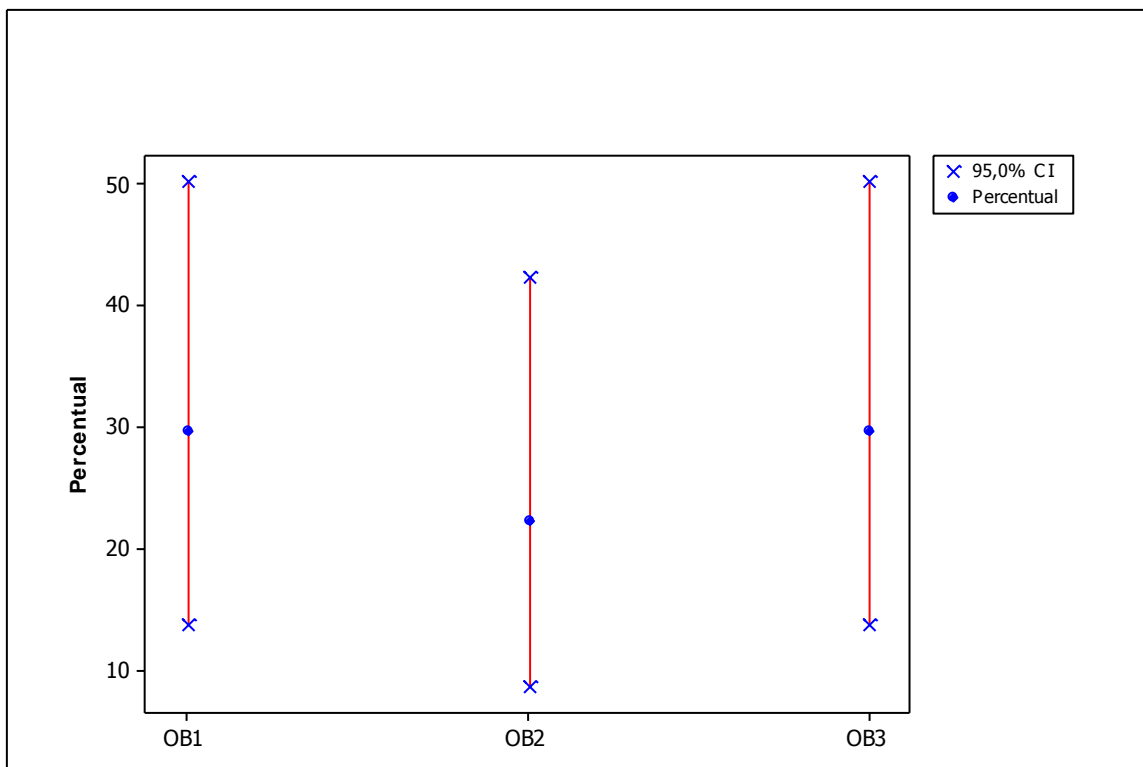


Figura 24 - Análise global da concordância de todos os observadores versus o teste de Papanicolaou, em relação ao grupo “ACB”.

Em relação ao grupo “ASC”, as concordâncias de cada observador versus o teste de Papanicolaou padrão estão sintetizadas na Tabela 8. A análise da concordância entre observadores está sintetizada na Tabela 9. Observa-se que, como no grupo “ACB”, a concordância foi nula ($Kappa = < 0$) entre cada observador versus o teste de Papanicolaou em relação ao grupo “ASC”, no diagnóstico de todos os tipos de lesões.

Em relação à concordância entre observadores, sintetizada na tabela 9, observa-se que para o diagnóstico de alterações benignas, ASC-US, ASC-H, LIEBG e LIEAG os valores de Kappa indicam concordância nula.

Tabela 8 - Análise das concordâncias do diagnóstico dos blocos de células dos observadores 1, 2 e 3 versus o teste de Papanicolaou em relação ao grupo “ASC”

Observador	Resposta	Kappa	DP ¹ Kappa	Z	p valor
1	0	-0,16	0,37	-0,44	0,67
	1	-0,55	0,37	-1,47	0,92
	2	*	*	*	*
	3	-0,27	0,37	-0,72	0,76
	4	*	*	*	*
	Global	-0,37	0,28	-1,31	0,90
2	0	-0,07	0,37	-0,20	0,58
	1	-0,75	0,37	-2,00	1,00
	2	-0,07	0,37	-0,20	0,58
	3	-0,16	0,37	-0,44	0,67
	4	-0,16	0,37	-0,44	0,67
	Global	-0,37	0,22	-1,70	0,95
3	0	-0,16	0,37	-0,44	0,67
	1	-0,27	0,37	-0,72	0,76
	2	*	*	*	*
	3	-0,07	0,37	-0,20	0,58
	4	*	*	*	*
	Global	-0,20	0,30	-0,67	0,74

¹ DP: Desvio padrão; grupo ASC: amostras classificadas como ASC-US ou ASC-H.

* Ausência de resposta. 0 = Alterações benignas; 1 = ASC-US; 2 = ASC-H; 3 = LIEBG; 4 = LIEAG. ASC: amostras classificadas como ASC-US ou ASC-H.

Tabela 9 - Análise da concordância do diagnóstico dos blocos de células entre os observadores 1, 2 e 3 em relação ao grupo “ASC”

Resposta	Kappa	DP ¹ Kappa	Z	p valor
0	-0,05	0,22	-0,23	0,60
1	-0,07	0,22	-0,32	0,62
2	-0,05	0,22	-0,23	0,60
3	0,06	0,22	0,30	0,38
4	-0,10	0,22	-0,48	0,68
Global	-0,03	0,12	-0,24	0,60

¹ DP: Desvio padrão. Grupo ASC: amostras classificadas como ASC-US ou ASC-H.

0 = Alterações benignas; 1 = ASC-US; 2 = ASC-H; 3 = LIEBG; 4 = LIEAG.

A análise da concordância de todos os observadores versus o teste de Papanicolaou está representada na Tabela 10. Novamente observa-se que a concordância de todos os observadores versus o teste de Papanicolaou foram nulas para o diagnóstico de alterações benignas, ASC-US e LIEBG em relação ao grupo “ASC”, com valores de Kappa de - 0,13; - 0,52 e - 0,17, respectivamente. Houve ausência de resposta para o diagnóstico de ASC-H e

LIEAG. A análise global da concordância de todos os observadores versus o teste de Papanicolaou, em relação ao grupo “ASC” também está representada na Figura 25.

Tabela 10 - Análise da concordância do diagnóstico dos blocos celulares de todos os observadores versus o teste de Papanicolaou em relação ao grupo “ASC”

Resposta	Kappa	DP ¹ Kappa	Z	p valor
0	-0,13	0,22	-0,62	0,73
1	-0,52	0,22	-2,41	1,00
2	*	*	*	*
3	-0,17	0,22	-0,78	0,78
4	*	*	*	*
Global	-0,31	0,15	-2,03	1,00

¹ DP: Desvio padrão. Grupo ASC: amostras classificadas como ASC-US ou ASC-H.

* Ausência de resposta. 0 = Alterações benignas; 1 = ASC-US; 2 = ASC-H; 3 = LIEBG; 4 = LIEAG.

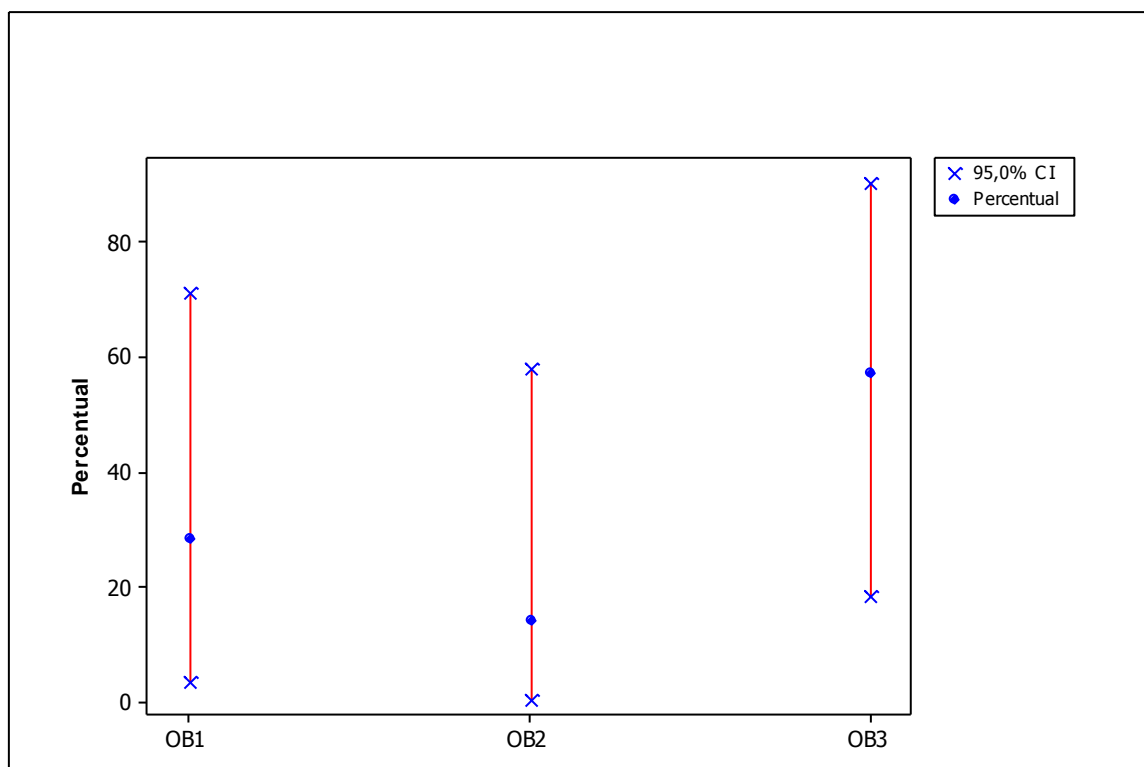


Figura 25 - Análise global da concordância de todos os observadores versus o teste de Papanicolaou, em relação ao grupo “ASC”.

Em resumo, as análises das concordâncias de cada observador versus o teste de Papanicolaou (padrão), das concordâncias entre observadores e da concordância de todos os observadores versus o teste de Papanicolaou

demonstraram grande variabilidade na avaliação dos blocos celulares corados pela HE, especialmente no diagnóstico do grupo “ACB”, com todos os testes Kappa apresentando valores entre regular e bom. Globalmente, os melhores resultados das taxas de concordâncias, indicados nas Figuras 24 e 25, foram, respectivamente para os grupos “ACB” e “ASC”, 29,63% dos observadores 1 e 3 (IC 95% variando entre 13,75% e 50,18%) e 57,14% do observador 3 (IC 95% entre 18,41% e 90,10%).

5.6 Expressão das proteínas RAP1, p16^{INK4A} e Ki-67

As análises comparativas e de desempenho da expressão imunocitoquímica das proteínas RAP1, p16 e Ki-67 no diagnóstico citopatológico dos blocos de células, foi subdividida nos grupos “ACB”, das 27 pacientes com conclusão diagnóstica de “alterações celulares benignas”, e “ASC”, das 7 pacientes com conclusões diagnósticas de “ASC-US” e “ASC-H”. Blocos de células HeLa foram utilizados como controle positivo de todas as reações imunoenzimáticas (Figura 26 a 28).

Para cada grupo, foram analisados os seguintes parâmetros:

- (i) percentagem de células positivas (menor que 10% ou maior que 10% de células com coloração positiva para RAP1 e p16 e menor que 1% ou maior que 1% de células com coloração positiva para Ki-67);
- (ii) localização da imunomarcação nas células;
- (iii) intensidade da coloração (classificada como 0, 1+, 2+, ou 3+). Para fins estatísticos, considerou-se a seguinte dicotomia: negativo, para intensidades 0 ou 1+; e positivo, para intensidades 2+ ou 3+.

Os resultados das reações imunocitoquímicas nos blocos de células HeLa demonstraram reatividade citoplasmática e nuclear, moderada a forte, para o anticorpo primário anti-RAP1 (Figura 26).

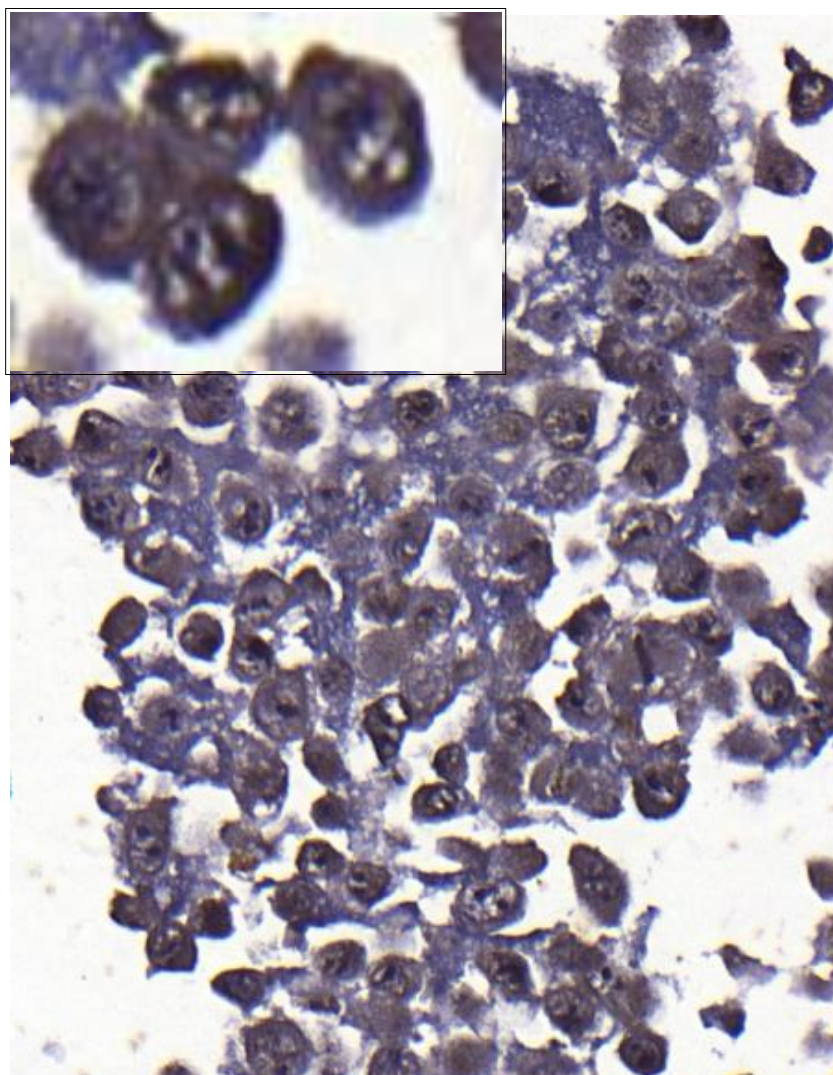


Figura 26 - Imunocoloração de RAP1 em células HeLa. Blocos de células HeLa foram utilizados como controle positivo em todos os experimentos de imunocitoquímica deste estudo.

Para os anticorpos primários anti-p16 e anti-Ki-67, a reatividade foi muito forte e localizada no citoplasma e núcleo para p16, e somente no núcleo para Ki-67, como demonstrado nas figuras 27 e 28, respectivamente.

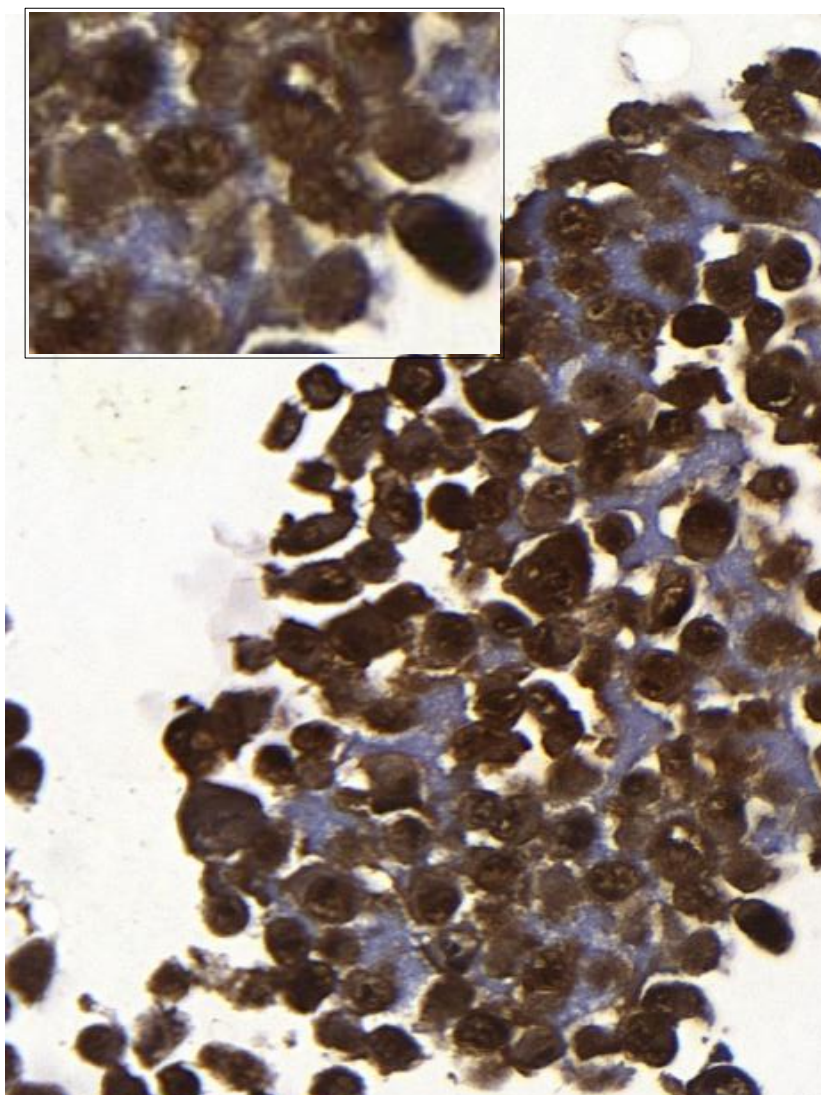


Figura 27 - Imunocoloração de p16 em células HeLa. Blocos de células HeLa foram utilizados como controle positivo em todos os experimentos de imunocitoquímica deste estudo.

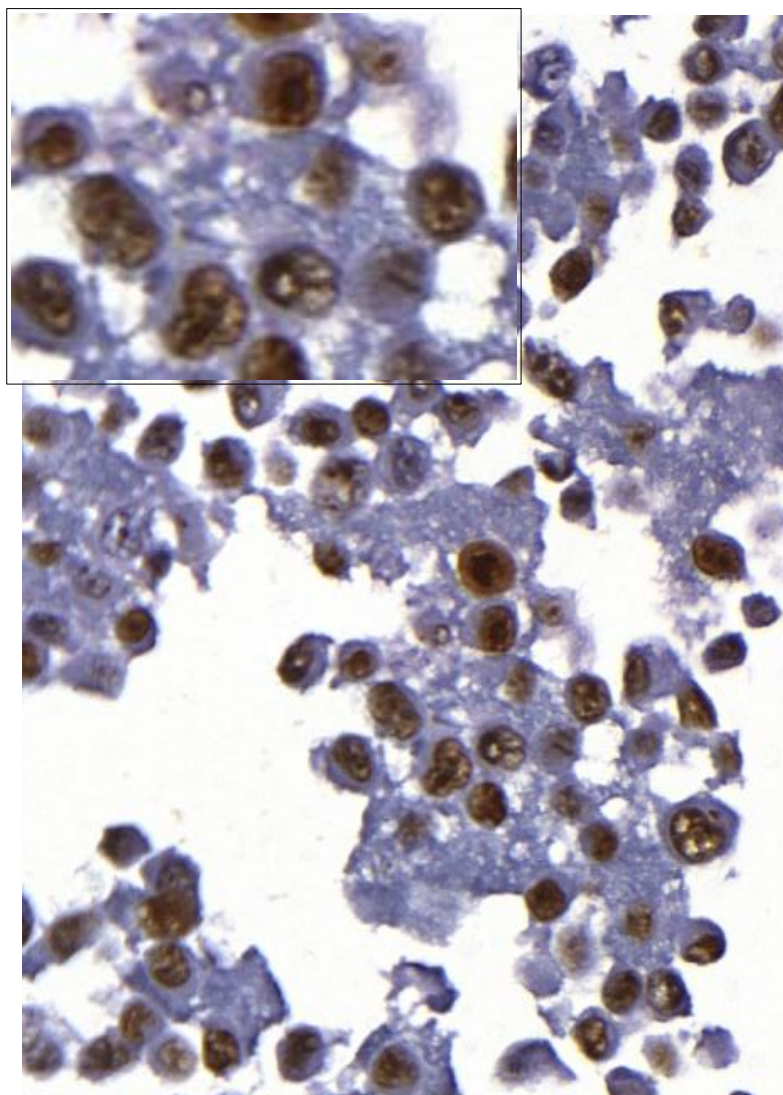


Figura 28 - Imunocoloração de Ki-67 em células HeLa. Blocos de células HeLa foram utilizados como controle positivo em todos os experimentos de imunocitoquímica deste estudo.

A análise imunocitoquímica da expressão de RAP1 nos blocos de células escamosas dos grupos “ACB” e “ASC” estão sintetizados na Tabela 11.

Tabela 11 - Parâmetros imunocitoquímicos de RAP1 em blocos de células dos grupos “ACB” e “ASC”

Parâmetro	Número de pacientes (%)		P valor*
	Grupo “ACB”	Grupo “ASC”	
Número total de amostras	27	7	--
Percentual de células com reação positiva para RAP1			
< 10%	11 (40,74)	3 (42,86)	0,920
> 10%	16 (59,26)	4 (57,14)	0,920
Localização celular da reação positiva para RAP1			
<i>Ausente</i>	5 (18,52)	1 (14,29)	0,000
<i>Citoplasma</i>	8 (29,63)	1 (14,29)	0,000
<i>Núcleo</i>	1 (3,70)	0 (0)	--
<i>Núcleo e citoplasma</i>	13 (48,15)	5 (71,43)	0,000
Intensidade da reação			
0	6 (22,22)	1 (14,29)	0,000
1+	6 (22,22)	3 (42,87)	0,000
2+	12 (44,44)	1 (14,29)	0,000
3+	3 (11,11)	2 (28,58)	--
Resultado da reação			
Negativo	12 (44,44)	4 (57,14)	0,022
Positivo	15 (55,56)	3 (42,86)	0,022

* P valor indica significância estatística da relação entre os grupos e parâmetros. “ACB” = amostras com alterações celulares benignas. ASC: amostras classificadas como ASC-US ou ASC-H.

As Figuras 29 e 30 ilustram os principais resultados da análise imunocitoquímica da proteína RAP1 nos blocos de células de acordo com os grupos “ACB” e “ASC”.

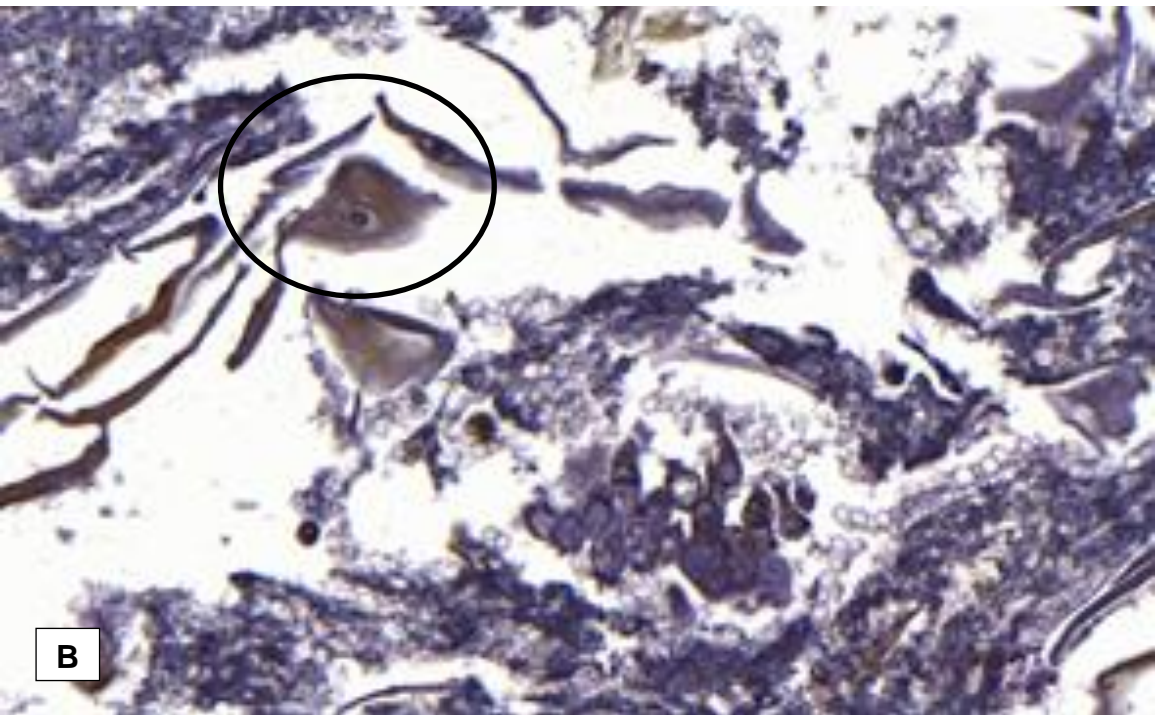
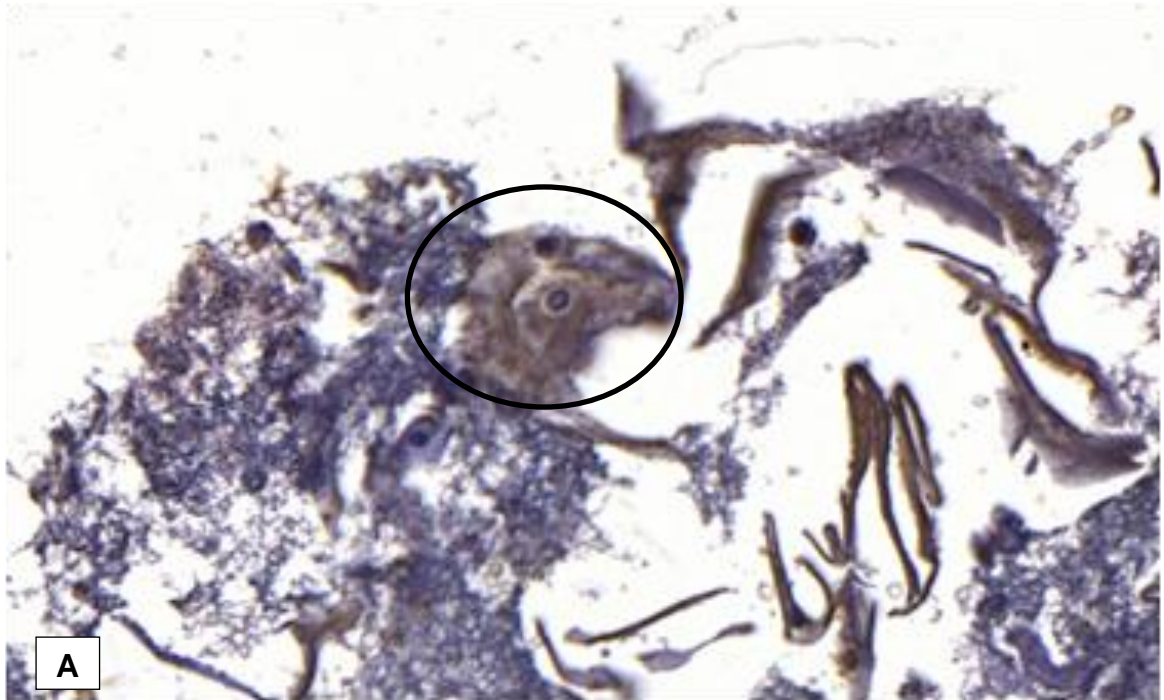


Figura 29 – Expressão de RAP1 nos blocos de células cervicais. A e B – Reatividade citoplasmática de RAP1 nas células escamosas superficiais reativas e nas células colunares. Aumento 40X.

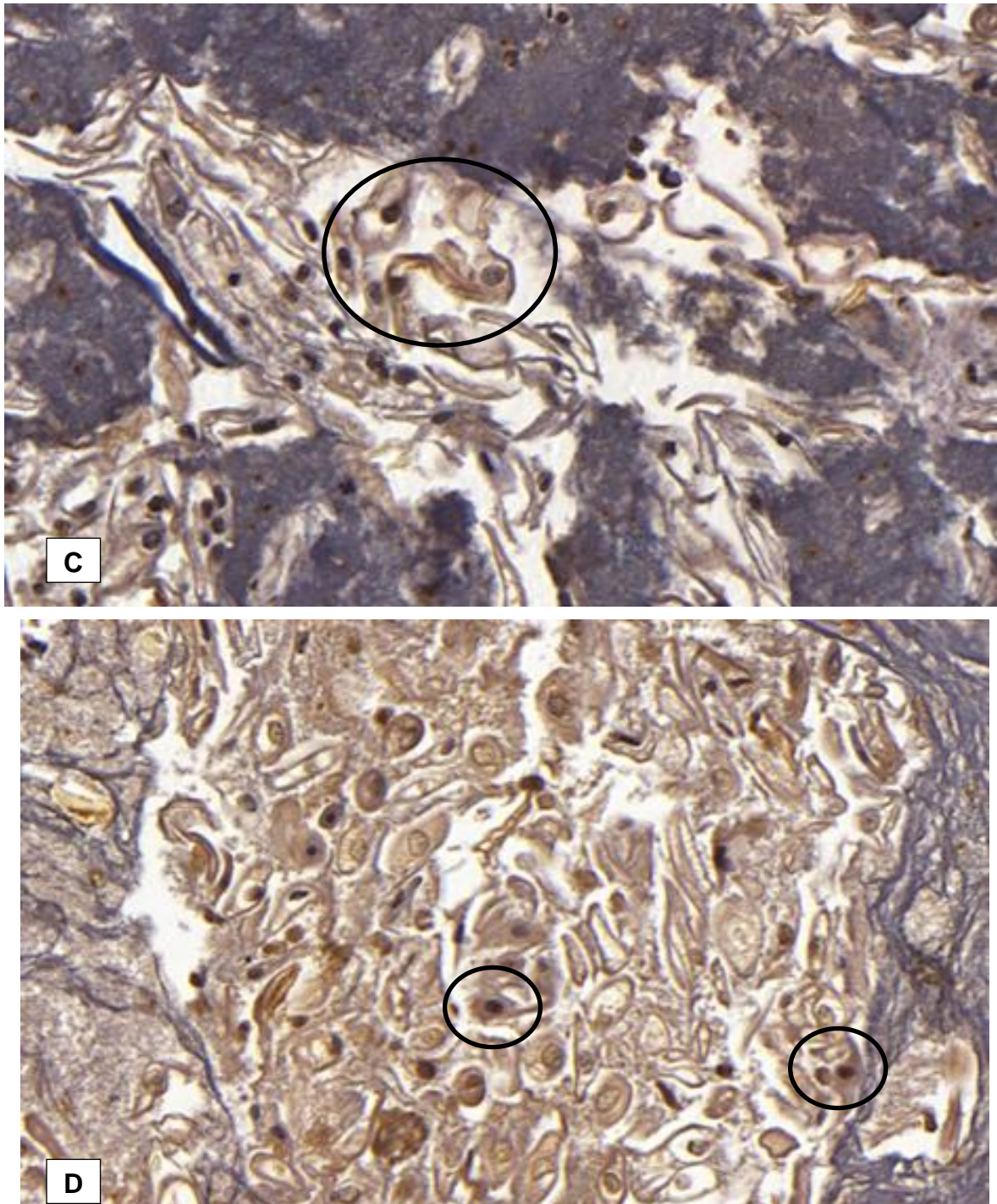


Figura 30 – Expressão de RAP1 nos blocos de células cervicais. C e D - Reatividade citoplasmática e nuclear de RAP1 nas células escamosas atípicas. Aumento 40X.

Em suma, a imunocitoquímica da proteína RAP1, em ambos os grupos, apresentou predomínio de 10% ou mais das células com reação positiva, localizada majoritariamente no citoplasma e no núcleo. Quanto à intensidade da reação, observou-se predomínio da intensidade moderada (2+) no grupo “ACB” e igualdade dos percentuais das intensidades fraca (1+) e moderada

(2+) no grupo “ASC”. Em conjunto, esses achados indicaram resultado positivo da proteína RAP1 na maioria das amostras do grupo “ACB” (15/27 ou 55,56%) e resultado negativo de RAP1 na maioria das amostras do grupo “ASC” (4/7 ou 57,14%).

Quando se compara o resultado da reação imunocitoquímica de RAP1 com o diagnóstico citopatológico convencional padrão (teste Papanicolaou) representado na Tabela 12, os resultados do desempenho da imunocitoquímica de RAP1 em relação ao diagnóstico dos grupos “ACB” e “ASC” demonstram sensibilidade de 16,66%, especificidade de 75,00%, valor preditivo positivo de 42,85% e valor preditivo negativo de 55,55%.

Tabela 12 - Resultados da imunocitoquímica de RAP1 e do teste de Papanicolaou

Citologia	Blocos de células		Total
	Grupo “ASC”	Grupo “ACB”	
Grupo “ASC”	3	4	7
Grupo “ACB”	15	12	27
Total	18	16	34

Graficamente, o resultado do desempenho da imunocitoquímica de RAP1 em relação ao diagnóstico dos grupos “ACB” e “ASC”, em relação ao teste Papanicolaou, está representado na curva ROC (Figura 31):

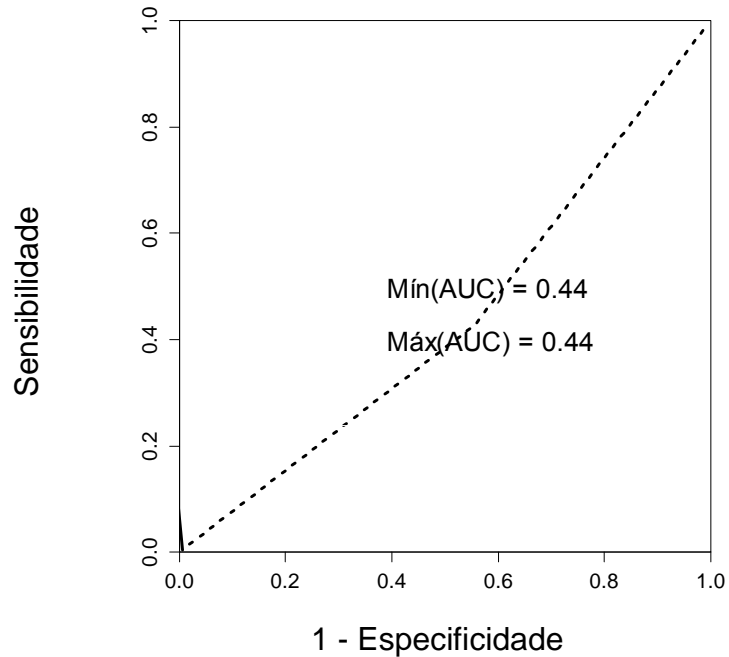


Figura 31 - Curva ROC da imunocitoquímica de RAP1 em relação ao teste de Papanicolaou.

Os resultados demonstram uma boa especificidade (75,00%). Entretanto, a sensibilidade (16,66%), os valores preditivos, positivo (42,85%) e negativo (55,55%) e a área sob a curva ROC (AUC= 0,44) demonstraram baixos valores para a aplicabilidade da imunocitoquímica de RAP1 na triagem do câncer do colo do útero.

Em relação à proteína p16, a tabela 13 sintetiza os resultados da análise imunocitoquímica desta proteína nos blocos de células, de acordo com os grupos “ACB” e “ASC”.

Tabela 13 - Parâmetros imuno-citoquímicos de p16 em blocos de células dos grupos “ACB” e “ASC”

Parâmetro	Número de pacientes (%)		P valor*
	Grupo “ACB”	Grupo “ASC”	
Número total de amostras	27	7	--
Percentual de células com reação positiva para p16			
< 10	25 (92,59)	7 (100,0)	0,300
> 10	2 (7,41)	--	--

Localização celular da reação			
positiva para p16			
Ausente	25 (92,59)	7 (100,0)	0,300
Citoplasma	2 (7,41)	--	--
Núcleo	--	--	--
Núcleo e citoplasma	--	--	--
Intensidade da reação			
0	25 (92,59)	7 (100,0)	0,300
1+	2 (7,41)	--	--
2+	--	--	--
3+	--	--	--
Resultado da reação			
Negativo	27 (100,0)	7 (100,00)	--
Positivo	--	--	--

*P valor indica significância estatística da relação entre os grupos e parâmetros.

“ACB” = amostras com alterações celulares benignas. ASC: amostras classificadas como ASC-US ou ASC-H.

A Figura 32 ilustra os principais resultados da análise imunocitoquímica da proteína p16 nos blocos de células, de acordo com os grupos “ACB” e “ASC”.

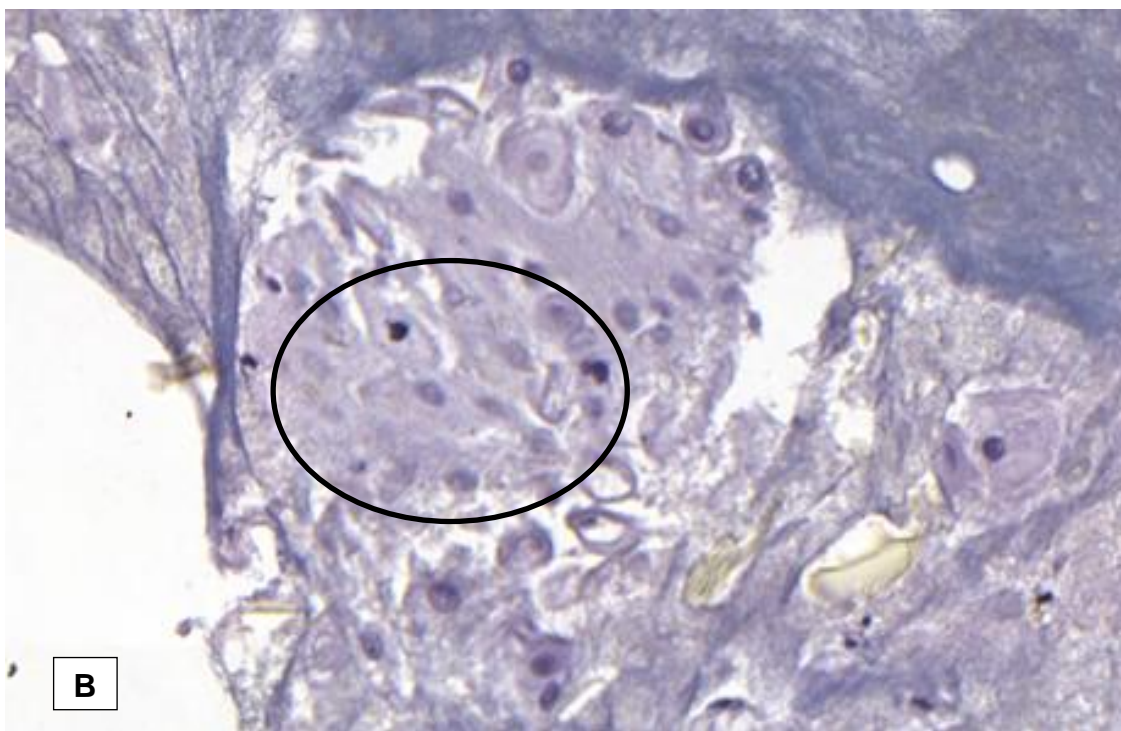
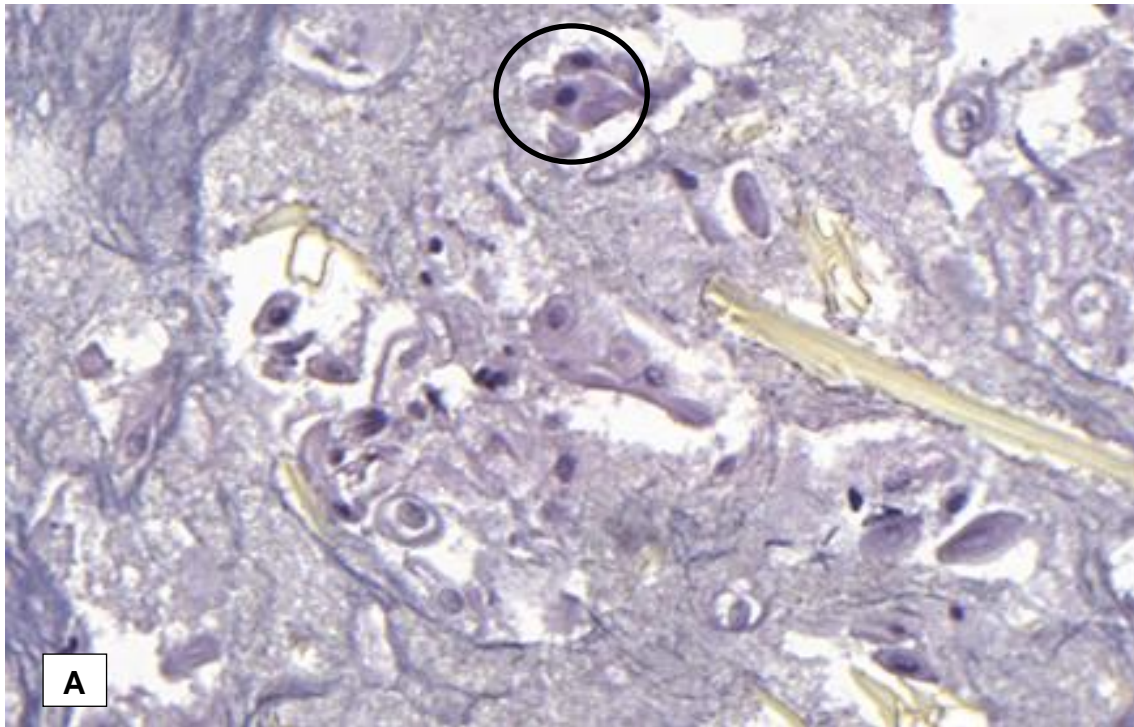


Figura 32 – Expressão de p16 nos blocos celulares. A e B – Agrupamento de células epiteliais reativas demonstrando discreta reatividade citoplasmática. Aumento 40X.

A tabela 14 sintetiza os principais resultados da análise imunocitoquímica da proteína Ki-67 nos blocos celulares nos grupos “ACB” e “ASC”.

Tabela 14. Parâmetros imuno-citoquímicos de Ki-67 em blocos celulares dos grupos “ACB” e “ASC”

Parâmetro	Número de pacientes (%)		P valor*
	Grupo “ACB”	Grupo “ASC”	
Número total de amostras	27	7	--
Percentual de células com reação positiva para Ki-67			
< 1	26 (96,30)	7 (100,0)	0,213
> 1	1 (3,70)	--	--
Intensidade da reação			
0	21 (77,78)	6 (79,41)	0,407
1+	3 (11,11)	1 (14,29)	0,407
2+	3 (11,11)	0 (0)	--
3+	0 (0)	0 (0)	--
Resultado da reação			
Negativo	24 (88,89)	7 (100,0)	0,407
Positivo	3 (11,11)	--	--

* P valor indica significância estatística da relação entre os grupos e parâmetros.

“ACB”: amostras com alterações celulares benignas. ASC: amostras classificadas como ASC-US ou ASC-H.

A Figura 33 ilustra os principais resultados da análise imunocitoquímica da proteína Ki-67 nos blocos de células, de acordo com os grupos “ACB” e “ASC”.

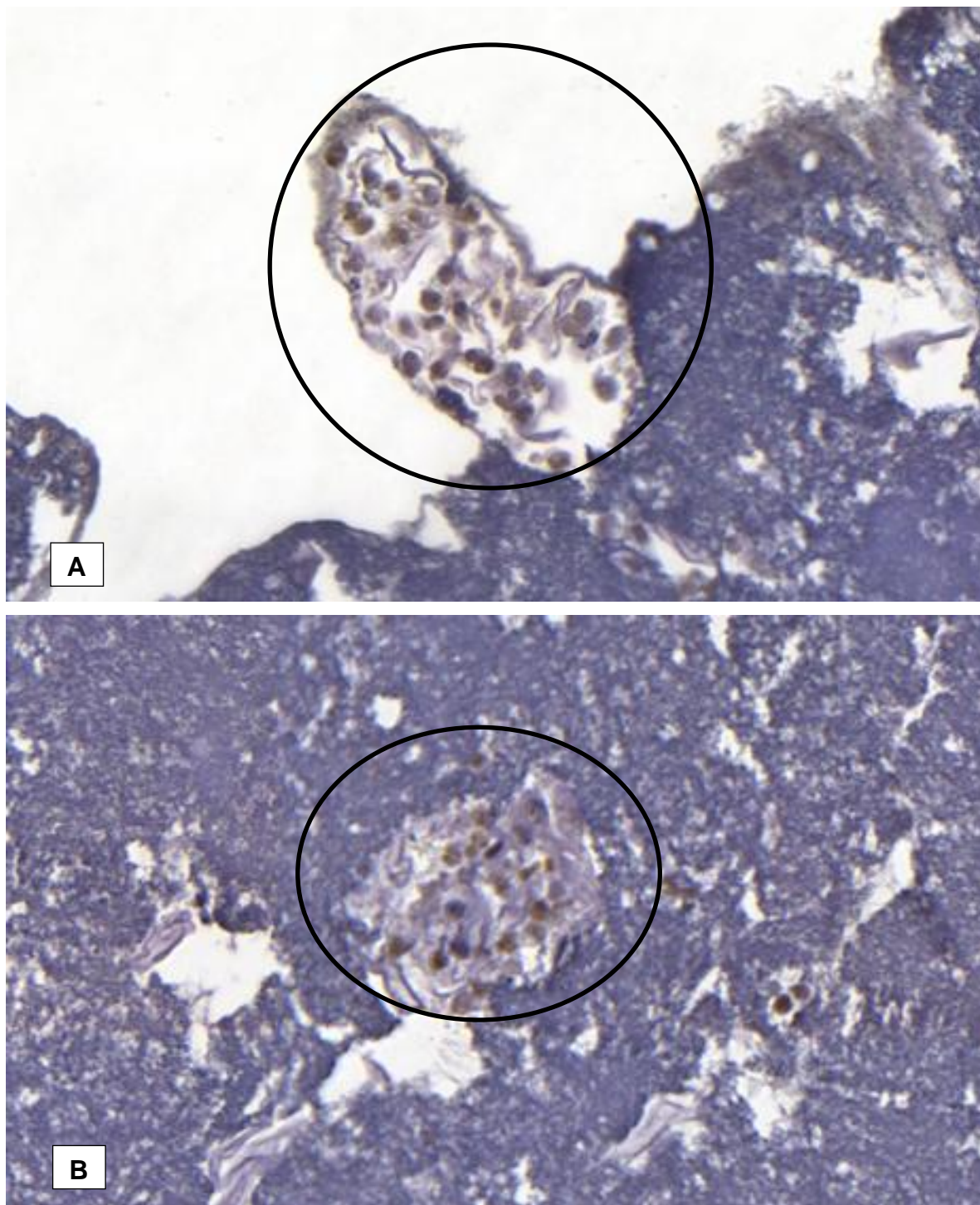


Figura 33 – Expressão de Ki-67 nos blocos de células cervicais. A e B – Agrupamento de células escamosas reativas demonstrando coloração nuclear fraca e moderada. Aumento 40X.

Em resumo, as reações imunocitoquímicas das proteínas p16 e Ki-67 demonstraram, em ambos os grupos, predomínio absoluto ou totalidade de resultados negativos, ou seja, ambos biomarcadores apresentaram combinações de uma maior quantidade de células sem reatividade com uma

menor quantidade de células fracamente reativas. Conseqüentemente, as comparações das expressões imunocitoquímicas de RAP1, p16 e Ki-67 apresentaram diferenças significativas entre RAP1 e Ki-67 ($p = 0,0018$) e diferenças não calculáveis com o biomarcador p16.

5.7 Verificação da presença de inibidores da PCR nas amostras cervicais e da integridade do DNA extraído

A verificação da presença de inibidores da PCR e da integridade do DNA extraído das amostras cervicais foi feita através da amplificação de um fragmento de 110 pb do gene da β -globina humana utilizando-se os iniciadores PC03 e PC04 (como descrito no item 5.5.2 de Material e Métodos) e está ilustrada na figura 34. A amplificação do fragmento de 110 pb do gene da β -globina humana foi verificada nas 7 amostras do grupo ASC e em 24 amostras do grupo "ACB". O DNA extraído de 3 amostras do grupo "ACB" que apresentaram amplificação negativa do fragmento de 110 pb do gene da β -globina humano também foram utilizados na *nested*-PCR para a detecção do genoma de HPV.

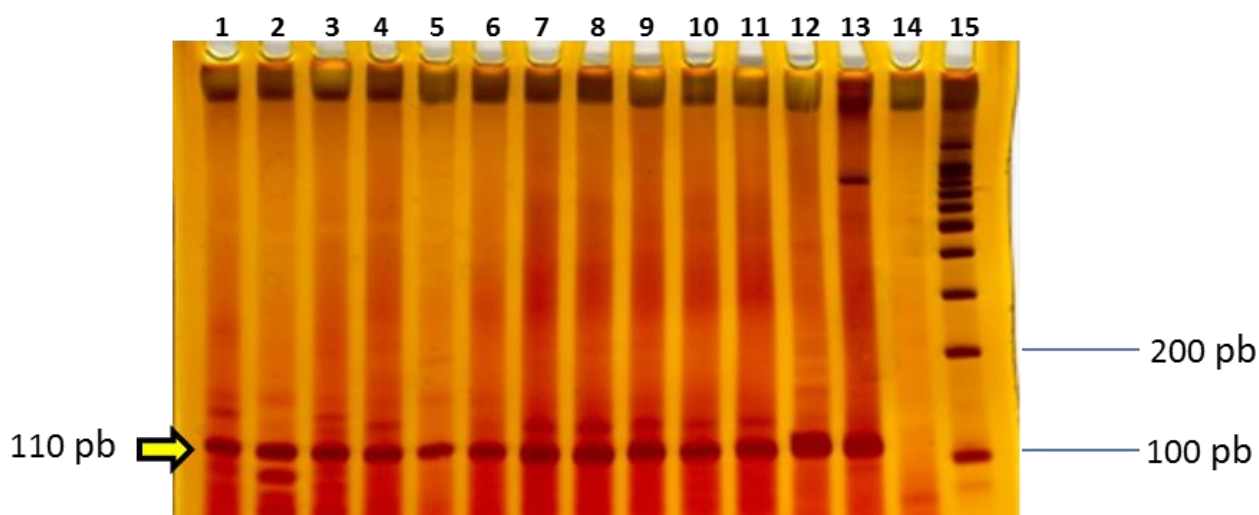


Figura 34 - Verificação da presença de inibidores da PCR através da amplificação de β -globina humana pela PCR. Gel representativo da amplificação do fragmento de 110 pb do gene de beta globina em amostras cervicais (como descrito no item 5.5.2 de Material e Métodos). Cinco microlitros da segunda reação de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel analítico de poliacrilamida a 8%. As canaletas 1 a 11 correspondem a amostras cervicais. Como controles positivos foram utilizados DNA extraído de leucócitos humanos (canaleta 12) e de DNA de células HeLa (canaleta 13). Como padrão de tamanho molecular (canaleta 15) foi utilizado 100 pb Ladder (Promega G210A) e como controle negativo foi utilizada água (canaleta 14).

5.8 Detecção e genotipagem do HPV

Os resultados da *nested-PCR* para a detecção do DNA viral nas amostras dos blocos celulares, de acordo com os grupos “ACB” e “ASC”, pela concordância dos métodos *nested-PCR* e sequenciamento, estão sintetizados na Tabela 15.

Tabela 15. Detecção do DNA de HPV nas amostras cervicais

DNA HPV	Grupo “ACB” (%)	Grupo “ASC” (%)	Total (%)
Positivo	09 (33,33)	04 (57,14)	13 (38,24)
Negativo	18 (66,67)	03 (38,24)	21 (61,76)
Total	27 (100,0)	07 (100,0)	34 (100,0)

“ACB”: amostras com alterações celulares benignas. ASC: amostras classificadas como ASC-US ou ASC-H.

O DNA de HPV foi detectado e confirmado por sequenciamento em 9 (33,33%) das 27 amostras “ACB”, assim como em 4 das 7 amostras do grupo ASC. Entre as amostras do grupo “ACB”, a maioria (66,67%) foi negativa.

A figura 35 exemplifica a amplificação do fragmento de 150 pb do gene L1 pela *nested-PCR* indicando a presença do DNA do HPV nas respectivas amostras cervicais.

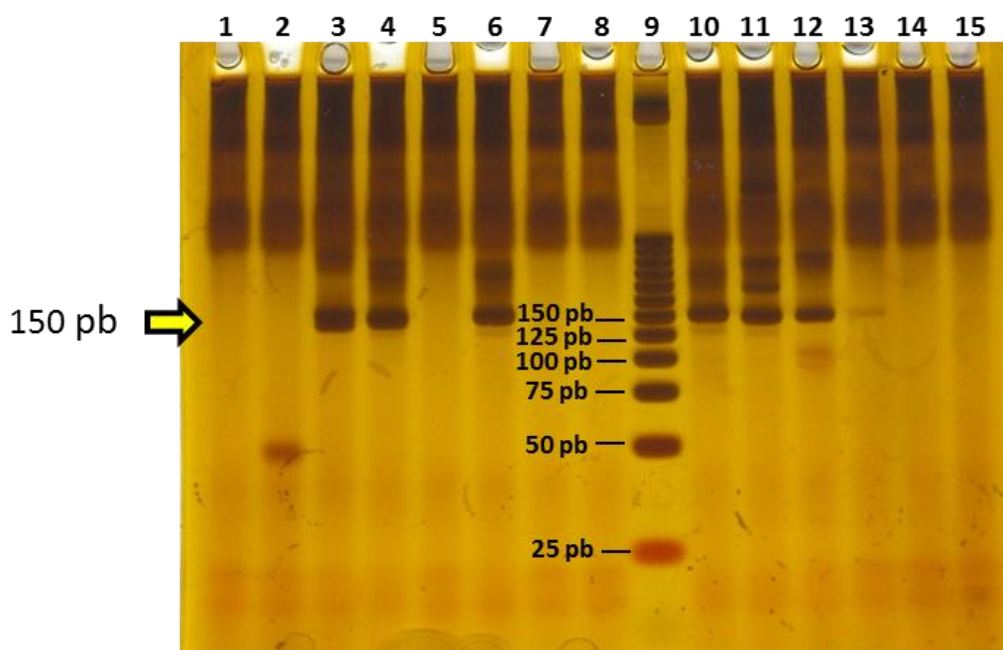


Figura 35 - Verificação da presença de DNA do HPV nas amostras cervicais. Gel analítico representativo dos experimentos de *nested-PCR* para a detecção do fragmento de 150 pb (indicado pela seta amarela) do gene L1 do HPV nas amostras cervicais. O DNA extraído de uma alíquota de amostras cervicais foi utilizado como molde para a *nested-*

PCR (como descrito no item 5.5.3 de Material e Métodos). Cinco uL da segunda reação de amplificação (com GP5+ e GP6+) foram submetidos à eletroforese em gel analítico de poliacrilamida a 8% corado pela prata. As canaletas 2, 4 a 8 e 10 a 15 correspondem a diferentes amostras cervicais. Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de células HeLa, que possui DNA do HPV18 integrado ao seu genoma (canaleta 3). Como padrão de tamanho molecular (canaleta 9) foi utilizado 25 pb DNA Step Ladder (Promega G4511) e como controle negativo foi utilizada água (canaleta 1).

Entretanto, foi verificada a presença de um amplicon de 175 pb na *nested-PCR* de 15 amostras cervicais (13 amostras do grupo “ACB” e 2 do grupo ASC) ao invés do amplicon esperado de 150 pb (Figura 36). Vale ressaltar que todos os amplicons foram purificados e sequenciados para genotipagem do HPV, inclusive os amplicons de 175 pb.

No entanto, o sequenciamento dos amplicons de 175 pb apresentou má qualidade impedindo a sua análise mas, em breve, tais fragmentos serão novamente sequenciados. Portanto, as respectivas amostras cervicais foram consideradas negativas para o DNA do HPV em todas as nossas análises.

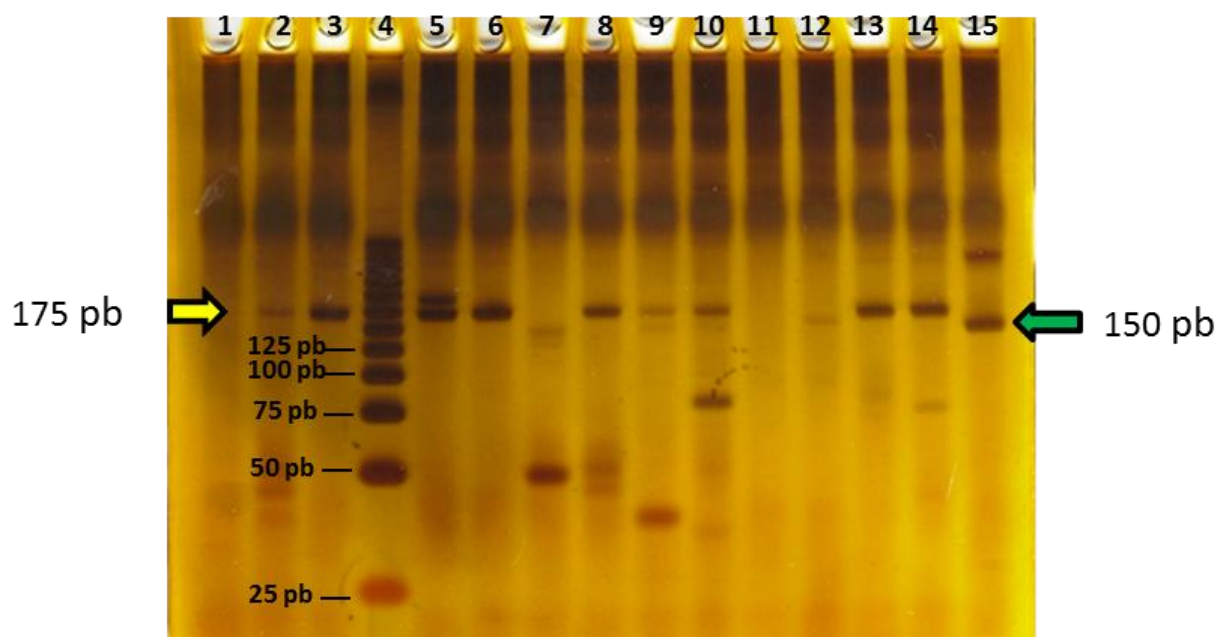


Figura 36: Detecção de DNA do HPV em amostras cervicais pela *nested-PCR*. Gel analítico representativo dos experimentos para a detecção do fragmento de 150 pb do gene L1 do HPV nas amostras cervicais. As bandas atípicas de 175 pb estão também indicadas por seta amarela. As canaletas 2, 3, 5 a 14 correspondem a diferentes amostras cervicais. Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de células HeLa, que possui DNA do HPV18 integrado ao seu genoma (canaleta 15). Como padrão de tamanho molecular (canaleta 4) foi utilizado 25 pb DNA Step Ladder (Promega G4511). Como controle negativo foi utilizado água (canaleta 1).

O sequenciamento do DNA do fragmento de 150 pb do gene L1 está sintetizado na Tabela 16.

Tabela 16. Genotipagem de HPV detectado nas amostras cervicais

Tipo de HPV	Grupo “ACB” (%)	Grupo “ASC” (%)	Total (%)
16	05 (55,56)	04 (100,0)	09 (69,23)
45	01 (11,11)	0 (0)	01 (07,69)
58	02 (22,22)	0 (0)	02 (15,38)
66	01 (11,11)	0 (0)	01 (07,69)
Total	09 (100,0)	04 (100,0)	13 (100,0)

“ACB”: amostras com alterações celulares benignas. ASC: amostras classificadas como ASC-US ou ASC-H.

A figura 37 exemplifica o cromatograma gerado após a reação de sequenciamento.

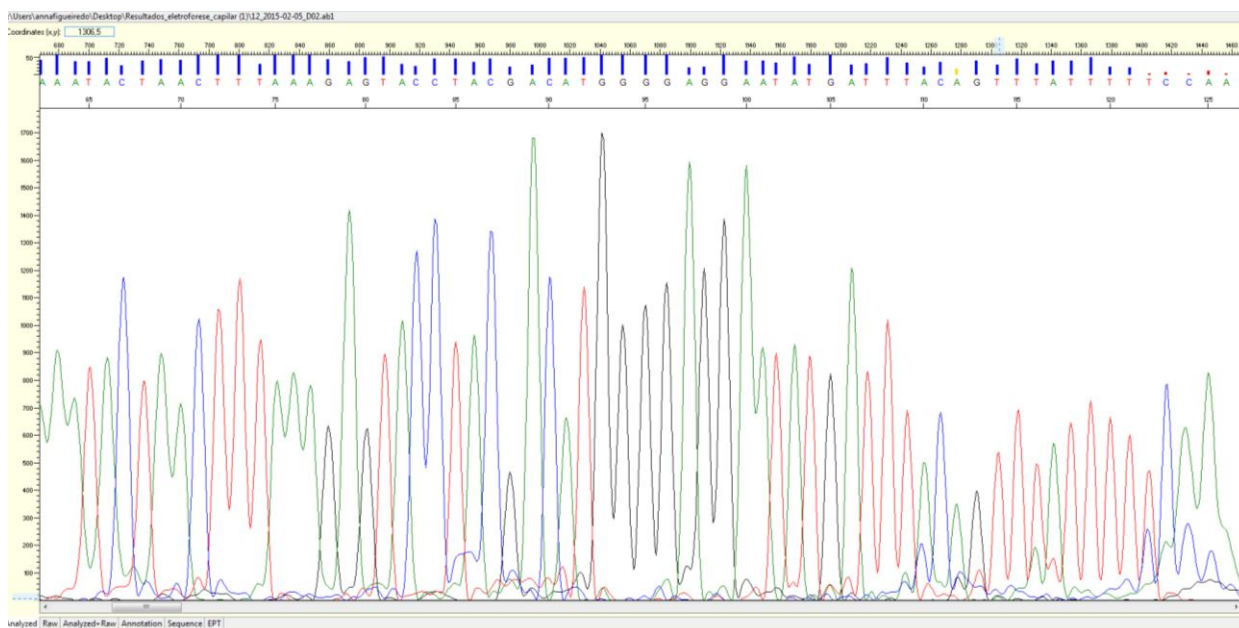


Figura 37 - Cromatograma parcial da sequência de DNA obtida do amplicon de 150 pb, de uma amostra cervical, gerado pelo sequenciador automático capilar ABI 3130 (Life Technologies).

O HPV-16, considerado de alto risco, foi detectado nas 4 amostras do grupo ASC. Em 9 amostras do grupo “ACB” foram detectados HR-HPV, sendo o HPV-16 detectado em 5 amostras, HPV-58 em 2 amostras, HPV- 45 em 1 amostra e HPV-66 em 1 amostra.

5.9 Relações entre a imunocitoquímica de RAP1 e o DNA do HPV

A relação entre a presença do DNA do HPV e a expressão imunocitoquímica de RAP1, pela análise de regressão logística binária, no grupo “ACB”, está representada na Tabela 17.

Tabela 17. Resultado da análise de regressão logística entre a presença do DNA do HPV e a expressão imunocitoquímica de RAP1 no grupo “ACB”

Preditor	Coefficiente	DP coeficiente	P valor
Constante	0,45	0,48	0,350
HPV	- 0,67	0,82	0,414

“ACB”: amostras com alterações celulares benignas.

Os resultados demonstraram inexistência de relação entre a presença do HPV e a expressão imunocitoquímica de RAP1, com *Odds Ratio* de 0,51 (IC 95% entre 0,10 e 2,57), no grupo “ACB”.

A relação entre a presença do DNA do HPV e a expressão imunocitoquímica de RAP1, pela análise de regressão logística binária, no grupo “ASC”, está representada na Tabela 18.

Tabela 18. Resultado da análise de regressão logística entre a presença do DNA do HPV e a expressão imunocitoquímica de RAP1 no grupo “ASC”

Preditor	Coefficiente	DP coeficiente	P valor
Constante	- 0,69	1,22	0,571
HPV	0,69	1,58	0,661

ASC: amostras classificadas como ASC-US ou ASC-H.

A inexistência de relação entre a presença do HPV e a expressão imunocitoquímica de RAP1, com *Odds Ratio* de 2,0 (IC 95% entre 0,09 e 44,35) também foi verificada no grupo “ASC” (tabela 18).

A associação direta entre a presença do DNA do HPV e a expressão imunocitoquímica de RAP1 encontra-se detalhada na Tabela 19.

Tabela 19. Associação entre a presença do DNA do HPV e a expressão imunocitoquímica de RAP1

Expressão de RAP1	DNA-HPV negativo (%)	DNA-HPV positivo (%)	Total (%)
Negativa	09 (42,86)	07 (53,85)	16 (47,06)
Positiva	12 (57,14)	06 (46,15)	18 (52,94)
Total	21 (100,00)	13 (100,0)	34 (100,0)

O resultado dos testes estatísticos para verificação da associação entre a presença do DNA do HPV e a expressão imunocitoquímica de RAP1 estão demonstrados na Tabela 20.

Tabela 20. Testes estatísticos para verificação da associação entre a presença do DNA do HPV e a expressão imunocitoquímica de RAP1

Teste estatístico	Resultado do teste	P valor
Qui-quadrado	0,389	0,533
Teste exato de Fisher	0,114	0,725
Mantel-Haenszel-Cochram	0,389	0,533

Em suma, os resultados dos 3 testes estatísticos utilizados (Qui-quadrado; Teste exato de Fisher e Mantel-Haenszel-Cochram) demonstraram inexistência de associação entre a presença do HPV e a expressão imunocitoquímica de RAP1 nas células escamosas reativas ou reparativas e atípicas, dos grupos “ACB” e “ASC”.

6 DISCUSSÃO

Nosso estudo padronizou o método de bloco de células para análise da expressão da GTPase RAP1 em células escamosas cervicais com alterações reativas, exclusivamente inflamatórias, e também em amostras cervicais com atipias de significado indeterminado (ASC), pelo método de imunocitoquímica. Tais amostras cervicais foram coletadas em meio líquido (CBL) as quais também foram submetidas a ensaios moleculares para detecção e genotipagem.

Os resultados obtidos acima são válidos porque reproduzimos rigorosamente os métodos publicados nos trabalhos de Rofagha & Vesey-Shecket, 2002, sobre blocos de células e de Pascoal-Xavier, 2011, sobre IHQ, PCR e sequenciamento do HPV. No método bloco de células, adaptamos a sequência que Rofagha & Vesey-Shecket, 2002 descreveu em líquido residual de citologia. Em relação à imunocitoquímica nos blocos de células, adaptamos o método utilizado pelo nosso grupo de pesquisa em trabalho prévio que demonstrou a expressão aumentada da proteína celular RAP1 em biópsias cervicais. Também seguimos todas as etapas dos métodos de PCR e sequenciamento desse trabalho.

No desenvolvimento desse estudo, identificamos algumas limitações relacionadas ao seu desenho, como o número relativamente pequeno de pacientes e a quantidade reduzida de células em algumas amostras de blocos celulares. Considerando o desenho do estudo (Figura 11), que definiu, a partir da recomendação de repetição da citologia cervical nas pacientes com citologia positiva (Protocolo interno do Ambulatório Jenny Faria), a seleção das pacientes pelo resultado do Teste de Papanicolaou positivo para ASC, o tempo para seleção de novos casos de ASC foi relativamente pequeno. Entretanto, obtivemos número relevante de casos para abordagem estatística paramétrica nos grupos estudados.

Em relação ao número reduzido de células nos blocos, a ponto de excluir 14 pacientes do grupo controle, destacamos, a seguir, alguns fatores considerados contribuidores. Os tecidos epiteliais, especialmente os de revestimento, são altamente resistentes à tração e suas células dificilmente se separam umas das outras, as células epiteliais apresentam-se envoltas por

uma camada glicoproteica com função adesiva (glicocálix), que contribui para a união entre elas. Além disso, existem outras estruturas especializadas que participam desse processo de adesão, como desmossomos. Além da influência da adesão celular epitelial, outros fatores que provavelmente contribuíram para o reduzido número de células foram: a desenvoltura de cada ginecologista no momento da coleta, a condição de cada paciente no momento da coleta e, fundamentalmente, a estratégia utilizada de coleta da citologia em meio líquido posteriormente à coleta de material para o Teste de Papanicolaou, decisão esta que tomamos para priorizar a rotina de diagnóstico das pacientes.

Neste estudo, considerando os seus critérios de inclusão (vide página 57), os novos exames de Papanicolaou diagnosticaram alterações celulares benignas em 8 (80%) e em 19 (76%) das pacientes dos grupos iniciais denominados como “Controle” e “ASC”, respectivamente. Esses percentuais reproduzem a história natural de ASC no Brasil (Pedrosa, 2003; Bueno, 2008), que indicam regressão para o normal em cerca de 70% das pacientes. Como o nosso objetivo era comparar a expressão da proteína RAP1 nas células epiteliais não displásicas versus células atípicas ou displásicas, reagrupamos as amostras cervicais de acordo com o resultado dos novos exames de Papanicolaou e foram estabelecidos os grupos “ACB” e “ASC”.

Inicialmente, foi verificada a adequabilidade das amostras de bloco de células. Em relação à adequabilidade, os resultados demonstraram um bom percentual (85%) de amostras satisfatórias. Entretanto, aproximadamente 15% das amostras dos grupos “ACB” e “ASC” apresentaram menos de 10 células epiteliais escamosas por lâmina na metade (10 mL) do líquido contido no frasco de ThinPrep reservada para a preparação do bloco de células, contribuindo para uma das limitações discutidas acima. Esse problema foi identificado, na revisão feita por Crapanzano e colaboradores (2014), como a principal causa de baixo rendimento celular e inadequabilidade do bloco de células. Também Jain e colaboradores (2014), ao revisar os métodos de preparação dos blocos de células, observaram que é necessário muito material para se obter um sedimento celular de boa qualidade.

Em seguida, foram avaliados vários parâmetros citopatológicos nas amostras de blocos de células. Nossos resultados demonstraram que o exame dos principais parâmetros citopatológicos da citologia convencional são bem

reproduzidos no exame dos blocos de células indicando que a preparação celular empregada não altera características como tamanho do núcleo, relação núcleo/citoplasma, dentre outras. Kruger e colaboradores (2014) também relataram a preservação das características morfológicas das células cervicais em blocos de células.

No entanto, quando se compara o diagnóstico final obtido pelo exame dos blocos de células com o diagnóstico citopatológico convencional padrão (teste de Papanicolaou) nossos resultados demonstram uma baixa sensibilidade, apesar da sua boa especificidade, ou seja, o bloco de células apresenta melhor probabilidade de ser negativo sabendo-se que a paciente examinada não tem lesão cervical. Dentre as possíveis explicações para a baixa sensibilidade, destacam-se a falta de padronização interna do método bloco de células e a incorporação de critérios amplamente subjetivos do Papanicolaou. Capranzano e colaboradores (2014) ao revisar a variação e a satisfação em relação ao bloco de células também encontraram baixa sensibilidade e apontaram a falta de critério e padronização como os principais fatores.

Em relação à variabilidade interobservador no diagnóstico dos blocos de células, as análises das concordâncias de cada observador versus o teste de Papanicolaou (padrão), das concordâncias entre observadores e da concordância de todos os observadores versus o teste de Papanicolaou demonstraram grande variabilidade na avaliação dos blocos celulares corados pela HE, especialmente no diagnóstico do grupo "ACB". Essa ampla variabilidade pode estar relacionada, dentre outros, aos fatores: amostras com reduzida celularidade, falta de padronização dos critérios de análise do bloco de célula e, principalmente, a subjetividade da análise citopatológica.

Alguns estudos demonstraram que a reprodutibilidade da interpretação de ASC é menor que 50% (Cox, 2005). Souza e colaboradores (2004), através de revisão de lâminas de colpocitologia oncótica, previamente diagnosticadas como ASC-US, realizaram comparação interensaios e interobservadores e confirmaram a existência de subjetividade nos laudos citopatológicos de ASC-US, além de critérios imprecisos empregados pelo mesmo observador para a obtenção desses resultados. Os autores observaram graus bastante distantes

de concordância entre diferentes análises do mesmo citopatologista, variando de 7,8 a 74,4%.

Diversas condições não neoplásicas e não relacionadas com a infecção pelo HPV podem produzir alterações similares às ASC, inclusive inflamação (Solomon *et al.*, 2005). Como exemplo, alterações citológicas de hiper Cromasia nuclear e halos perinucleares relacionados à infecção por *Candida sp* podem simular alterações compatíveis com ASC (Lima *et al.*, 2002). Miguel e colaboradores (1996) analisaram 50 esfregaços cérvico-vaginais dos quais 16 foram inicialmente interpretados como ASC-US e 34 como normais. Após revisão utilizando critérios de Bethesda para ASC-US e conhecendo as mudanças associadas à presença de *Candida sp*, 10 dos 16 casos de ASC-US foram reclassificados como normais.

Assim, concluindo a discussão sobre os dois primeiros objetivos específicos do estudo, descrição do método do bloco de células e análise da concordância interobservadores em relação ao diagnóstico de ASC nos blocos celulares, nossos resultados indicam a utilização do bloco de células como um método auxiliar ao exame convencional de Papanicolaou, principalmente em amostras duvidosas, devido sua elevada especificidade e a possibilidade de utilização de técnicas adicionais, como imunocitoquímica e PCR (Rofagha & Vesey-Shecket, 2002; Jain *et al.*, 2014).

Em relação ao terceiro e principal objetivo específico do estudo, ou seja, a comparação do padrão imunocitoquímico de expressão da proteína RAP1 em blocos de células cervicais, nossos resultados demonstraram baixos valores para a aplicabilidade da imunocitoquímica de RAP1 na triagem do câncer do colo do útero. A hiperexpressão da proteína RAP1 observada na maioria das amostras do grupo "ACB" (15/27 ou 55,56%) e negatividade ou expressão basal de RAP1 na maioria das amostras do grupo "ASC" (4/7 ou 57,14%), sugere a associação da expressão da proteína RAP1 com a atividade inflamatória e a reatividade presente nas amostras do grupo ACB. Como esperado, as reações imunocitoquímicas das proteínas p16 e Ki-67 (utilizadas como referência de biomarcadores já conhecidos) demonstraram, em ambos os grupos, predomínio absoluto ou totalidade de resultados negativos, ou seja, tanto p16, quanto Ki-67 estão mais associadas com distúrbios ou desregulações do ciclo celular em estágios mais adiantados da

displasia epitelial cervical (Akpolat *et al.*, 2004; Halloush *et al.*, 2008; Tsoumpou *et al.*, 2009; Pascoal-Xavier, 2011; Shidham *et al.*, 2011; Portari *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015).

Vários estudos identificaram a participação da proteína RAP1 no desenvolvimento da atividade inflamatória (Dorn *et al.*, 2012; Schimd *et al.*, 2013; Birukova *et al.*, 2014; Yoshida *et al.*, 2014; Poon *et al.*, 2015). Entretanto, não há nenhuma publicação sobre a associação de RAP1 e inflamação do colo uterino. Yoshida e colaboradores (2014) investigaram o papel da proteína afadin na expressão de citocinas em ceratinócitos murinos durante inflamação induzida quimicamente pela droga TPA (12-Otetradecanoilforbol-13-acetato) em camundongos deficientes de afadin (CKO). Afadin é uma proteína de ligação a actina mediadora de sinalização da proteína de adesão nectina. Através de RT-qPCR e imuno-histoquímica foi avaliado o nível de expressão de citocinas inflamatórias, incluindo *CXCL1*, *CXCL2*, *IL1-β* e *TNF-α*, *TGF-β* e *S100A8*. Em cultura de queratinócitos foi avaliado o nível de expressão das citocinas *CXCL2*, *IL1-β*, *TNF-α* e a expressão da proteína RAP1 GTPase. Entre estes genes, os níveis de expressão de *CXCL2*, *IL-1 β* e *TNFα* foram reduzidos na pele de camundongos CKO em comparação com os níveis de expressão na pele de camundongos selvagens. A análise imuno-histoquímica da pele tratada com TPA durante 3 dias, confirmou que os níveis de expressão de *CXCL2*, *Il-1β* e *TNF-α* foram reduzidos em pele de CKO em comparação com a pele do controle. Em seguida, o efeito da deficiência de afadin sobre a expressão de citocinas em ceratinócitos murinos foi investigada *in vitro*. Cultura de ceratinócitos de camundongos neonatos deficientes em afadin foram tratadas com TPA e novamente o nível de expressão de *CXCL2*, *Il-1β* e *TNF-α* foram mais baixos nos ceratinócitos de CKO quando comparados aos ceratinócitos controle. Foi observado um aumento significativo da expressão de RAP1 em cultura de ceratinócitos tratados com TPA quando comparados a ceratinócitos de camundongo CKO tratados com TPA. Este estudo sugere a participação de afadin no aumento da expressão de citocinas através da ativação de RAP1 em ceratinócitos murinos durante a inflamação.

Portanto, uma provável explicação para a alteração da proteína RAP1 nas amostras do grupo ACB seria decorrente da inflamação do colo uterino, comumente observada em mulheres com resultado normal na citologia

oncológica. A inflamação cervical é devida, principalmente, à infecção (em geral, mista ou por vários microorganismos), mas outros fatores como o uso de dispositivo intrauterino (DIU), traumatismo e irritantes químicos como géis ou cremes induzem inflamação no colo do útero. Assim, entendemos que estudos adicionais sobre expressão da proteína RAP1 e seus reguladores, em células epiteliais associadas à inflamação, serão necessários para identificar o mecanismo de ativação da proteína RAP1 em inflamação do colo do útero.

Por fim, considerando a taxa de detecção do DNA do HPV nas amostras cervicais e relação da presença do HPV com a expressão de RAP1, observamos a detecção do DNA de HPV em 33,33% e 57,14% das amostras dos grupos “ACB” e “ASC”, respectivamente. Todas as amostras do grupo “ASC” apresentaram o HPV-16. Um predomínio deste HPV de alto risco também foi observado entre as amostras positivas para DNA viral do grupo “ACB”, reproduzindo o percentual deste vírus, o HPV-16, nos estudos epidemiológicos. Os resultados de detecção de HPV se assemelham ao trabalho de Paesi e colaboradores (2015), esses autores observaram 60% de positividade de HPV em pacientes com ASC.

A prevalência e distribuição de genótipos de HPV variam muito em todo o mundo. As diferenças podem estar relacionadas com a interação complexa entre os diferentes tipos de HPV e características biológicas, além da localização geográfica da população do estudo (Wang *et al.*, 2013). Nos países da América do Sul, como Paraguai e Brasil, os HPV-16 e HPV-18 foram relatados serem os tipos predominantes relacionados ao câncer cervical invasivo, seguido por HPV-45, HPV-33, HPV-31, HPV-52, HPV-35 e HPV-39 (Fernandes *et al.*, 2009; Kasamatsu *et al.*, 2012). A presença de HPV de alto risco entre pacientes com diagnóstico de “ACB” e “ASC” exige gestão cautelosa dessas pacientes, incluindo administrar tratamentos adequados para reduzir o risco de desenvolver carcinoma.

Observamos inexistência de relação entre a presença do HPV e a expressão imunocitoquímica de RAP1 nos grupos “ACB”, com *Odds Ratio* de 0,51 (IC 95% entre 0,10 e 2,57), e “ASC”, com *Odds Ratio* de 2,0 (IC 95% entre 0,09 e 44,35), respectivamente. Estes resultados demonstram que além de expressão aumentada de RAP1 em displasias mais avançadas, com participação do HPV, como visto por Pascoal-Xavier *et al.*, 2015 (em anexo),

sua expressão também está aumentada em ambiente inflamatório e não está, necessariamente, associada a presença do HPV.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo, foi possível concluir que:

O exame dos blocos de células escamosas pode complementar o teste de Papanicolaou na triagem do câncer do colo uterino;

A proteína RAP1 está associada às alterações celulares benignas, reacionais ou reparativas;

A expressão da proteína RAP1 não está associada à presença do HPV nas células escamosas reacionais ou atípicas;

A imunocitoquímica de RAP1 não é um bom teste de triagem para mulheres com atipias de células escamosas (“ASC”).

8 PERSPECTIVAS

Otimizar a técnica de bloco celular para aumentar o número de células;

Ampliar a amostragem, com inclusão de amostras de lesão intraepitelial de baixo grau, lesão intraepitelial de alto grau e carcinoma de células escamosas;

Utilizar amostras de citologia em meio líquido residual;

Compreender a participação de RAP1 nas alterações celulares benignas, particularmente inflamatórias.

9 ANEXOS

9.1 Termo de consentimento livre e esclarecido para coleta prospectiva de citologia em mulheres adultas

Propósito do Projeto

Gostaríamos de convidá-la a participar de um projeto de pesquisa chamado “**Caracterização da expressão da proteína Rap1 GTPase em lesões intraepiteliais escamosas associadas à infecção por papilomavírus humano provenientes de citologia cervical**”. O propósito desse projeto é descrever as alterações da proteína Rap1 GTPase nas lesões do colo uterino e, conseqüentemente, obter melhores formas de prevenção, detecção e tratamento do câncer do colo uterino.

Iremos examinar ou quantificar as alterações desta proteína, molécula ou biomarcador nas células doadas por você para detectar possíveis diferenças com células não alteradas. O mesmo processo ou exame será realizado com células de outras doadoras que concordarem em participar do presente projeto de pesquisa. Desta forma, esperamos identificar alterações moleculares associadas ao câncer do colo uterino.

Descrição da Pesquisa

Coleta de Amostras

Durante a consulta de retorno no ambulatório de Ginecologia da Unidade Jenny Farias do Hospital das Clínicas/UFMG, você realizará o exame do colo uterino. Neste exame, logo após a coleta de material para o teste de Papanicolaou, uma pequena quantidade de células do colo uterino será coletada por uma pequena escova e armazenada em frasco com meio líquido.

Codificação das Amostras

O frasco com as células será rotulado com um número de identificação confidencial designado pelo projeto. Apenas o **Dr. Marcelo A. Pascoal Xavier** do **Hospital das Clínicas/UFMG** poderá relacionar o código às informações identificáveis, como o seu nome, endereço, número de telefone ou CPF. O **Dr. Marcelo A. Pascoal Xavier** manterá as informações que possibilitam a correlação do código confidencial com as informações identificáveis em uma base de dados protegida. Apenas pessoal autorizado, que especificamente concordou em proteger a sua identidade, terá acesso a essa base de dados. Todos os materiais serão rotulados com um número de identificação designado pelo projeto, removendo as informações normalmente identificáveis, como o seu nome, endereço, número de telefone ou CPF. Nenhum dos demais pesquisadores e pessoas envolvidas, incluindo as pessoas que irão trabalhar com as suas amostras e informações médicas, terá acesso a nenhuma das suas informações identificáveis.

Armazenamento e Destinação de Amostras

As suas amostras codificadas serão enviadas ao Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG para armazenamento e realização dos exames previstos no projeto.

Compensação Financeira/Custos

Você não será paga para participar do projeto. As suas amostras e as suas informações médicas serão utilizadas para fins de pesquisa apenas e não serão comercializadas. É possível que parte da pesquisa conduzida com as suas amostras ou informações médicas leve, no fim, ao desenvolvimento de novos exames diagnósticos ou outros produtos comerciais. Caso isso ocorra, você não receberá nenhuma parte dos lucros gerados com a comercialização de tais produtos.

Possíveis Benefícios da Participação no Projeto

Você poderá se beneficiar, nesta pesquisa, com a realização e o resultado da pesquisa da detecção e genotipagem do DNA do HPV, exame que complementa o teste do Papanicolaou. Outro benefício é a produção de conhecimento para formas mais eficientes de prevenção, detecção, tratamento e cura do câncer cervical no futuro.

Possíveis Riscos da Participação no Projeto

Riscos Físicos

Os riscos ocasionalmente associados ao exame especular e colposcopia do colo uterino incluem discreta dor ou desconforto e pequeno sangramento no local (raramente). Para minimização dos riscos físicos, as pacientes serão monitoradas cuidadosamente durante a consulta ambulatorial.

Riscos Sociais Associados com a Perda de Privacidade

A quebra de confidencialidade é, provavelmente, o maior risco da participação no estudo. Todos os esforços serão empreendidos para minimizar esse risco, incluindo codificação alfanumérica do nome das pacientes protegida por senha.

Confidencialidade

Iremos empreender todos os esforços para proteger a sua confidencialidade e para garantir que a sua identidade permaneça desconhecida. O presente formulário de consentimento assinado será armazenado em um arquivo protegido, que será acessível apenas às pessoas autorizadas envolvidas neste projeto. Iremos seguir rigorosamente o plano de codificação, armazenamento e liberação mencionado na seção *Descrição da Pesquisa*.

Resultados do Projeto

Os resultados dos exames realizados neste projeto de pesquisa não serão devolvidos a você ou inseridos nos seus registros médicos. Se a pesquisa deste projeto for publicada em jornais científicos, não serão mencionadas informações tradicionalmente identificáveis, como o seu nome, endereço, número de telefone ou CPF, na publicação.

Alternativas à Participação no Projeto

A opção alternativa é não participar do projeto.

Participação Voluntária

A escolha em participar desta pesquisa através da doação de células e informações médicas é integralmente do paciente. **Independente da sua decisão, o seu tratamento médico não será afetado.**

Saída do Projeto

Uma vez que as suas amostras codificadas tenham sido distribuídas aos laboratórios participantes da pesquisa, e as suas informações tenham sido transferidas às bases de dados adequadas, você **não** poderá retirar as suas informações do presente projeto de pesquisa. Entretanto, você pode solicitar a devolução ou destruição das amostras celulares se desejar.

Informações de Contato

Em caso de dúvidas sobre o projeto ou a sua participação, contate a pessoa a seguir:

Para perguntas sobre os seus direitos como participante voluntário em pesquisas:

Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antonio Carlos, 6627 – Pampulha
Belo Horizonte, MG – Tel: (31) 3409-4592

Para perguntas sobre o estudo:

Investigador Principal: Dr. Marcelo A. Pascoal Xavier
Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Dr Alfredo Balena, 190 – Santa Efigênia
Belo Horizonte, MG – Tel: (31) 3409-9123

Anuência em Participar do Projeto

A fim de participar desta pesquisa, você deve concordar com TODAS as declarações a seguir:

- Concordo voluntariamente em doar células do colo uterino que serão utilizadas neste projeto de pesquisa.
- Concordo que minhas informações citológicas codificadas e minhas informações médicas codificadas sejam colocadas em bases de dados, conforme descrito na seção *Armazenamento e Destinação de Amostras e Informações Médicas*, na página 1 do presente documento.
- Compreendo que minhas informações codificadas, inseridas em bases de dados, serão utilizadas neste projeto de pesquisa.

Forneço, voluntariamente, consentimento para que eu participe, conforme as seis declarações listadas acima.

Assinatura do Participante

Data: ____/____/____
Dia Mês Ano

A SEÇÃO A SEGUIR PRECISA SER PREENCHIDA POR UMA TESTEMUNHA QUE OBSERVOU TODO O PROCESSO REFERENTE A PARTICIPANTES QUE NÃO SABEM LER OU ESCREVER:

Estava presente quando os benefícios, riscos, procedimentos e armazenamento de amostras foram lidos ao participante. O participante teve oportunidade de fazer perguntas sobre a sua participação no estudo e concordou em participar desta pesquisa.

Data: ____/____/____
Dia Mês Ano

Assinatura da Testemunha:

Data: ____/____/____
Dia Mês Ano

Assinatura do Entrevistador:

9.2 Projeto; CAAE – 27320814.4.0000.5149



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE - 27320814.4.0000.5149

Interessado(a): **Prof. Marcelo Pascoal**
Departamento de Anatomia Patológica e
Medicina Legal
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 12 de março de 2014, o projeto de pesquisa intitulado "Expressão de pequena GTPASE em lesões intraepiteliais escamosas associadas à infecção por papilomavírus humano provenientes de citologia cervical" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

9.3 Artigo

RESEARCH ARTICLE

RAP1 GTPase Overexpression is Associated with Cervical Intraepithelial Neoplasia

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

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

© These authors contributed equally to this work.

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

† These authors are senior authors on this work.

* jague@cpqr.fiocruz.br



OPEN ACCESS

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

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

Received: October 15, 2014

Accepted: February 19, 2015

Published: April 9, 2015

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

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

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

Abstract

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

Introduction

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

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

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

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

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

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

Materials and Methods

Ethics Statement

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

Study Participants

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

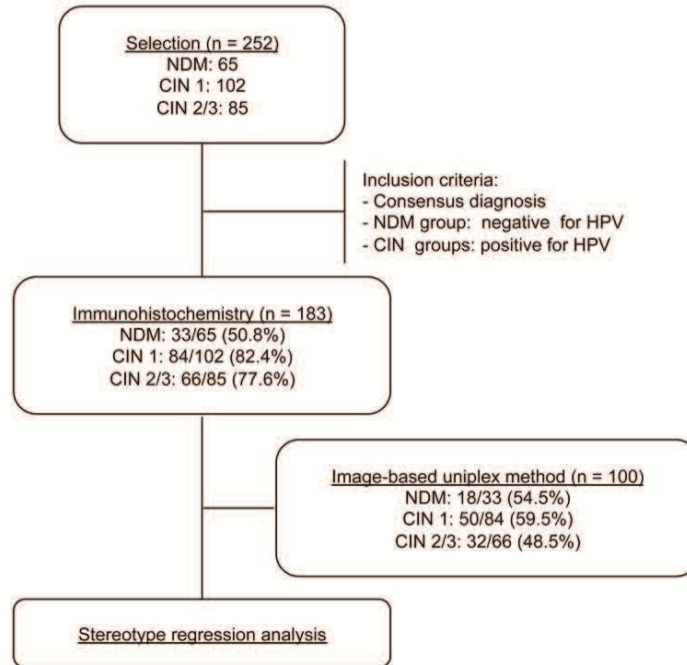


Fig 1. Study procedures and outcomes. The flow diagram shows the number of samples that were obtained from the laboratory file as well as those that were included in the immunohistochemistry and statistical analyses.

doi:10.1371/journal.pone.0123531.g001

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

HPV genotyping

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

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

Immunohistochemistry

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

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

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

Statistical analysis

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

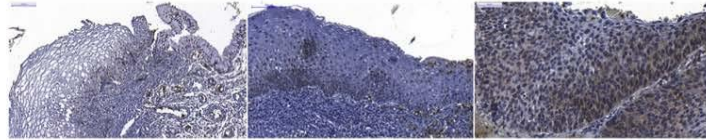


Fig 2. Immunohistochemical staining of RAP1. Left—Squamocolumnar junction of non-dysplastic cervical mucosa (NDM) showing very weak immunostaining for RAP1 in the cytoplasm of basal cells and no staining in the intermediate and superficial cells. Middle—CIN 1 showing moderate staining for RAP1 in cells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

doi:10.1371/journal.pone.0123531.g002

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

Results

RAP1 expression and HPV detection

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

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

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

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

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

doi:10.1371/journal.pone.0123531.t001

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

Morphometric evaluation of RAP1 expression

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

Overexpression of RAP1 and CIN progression

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

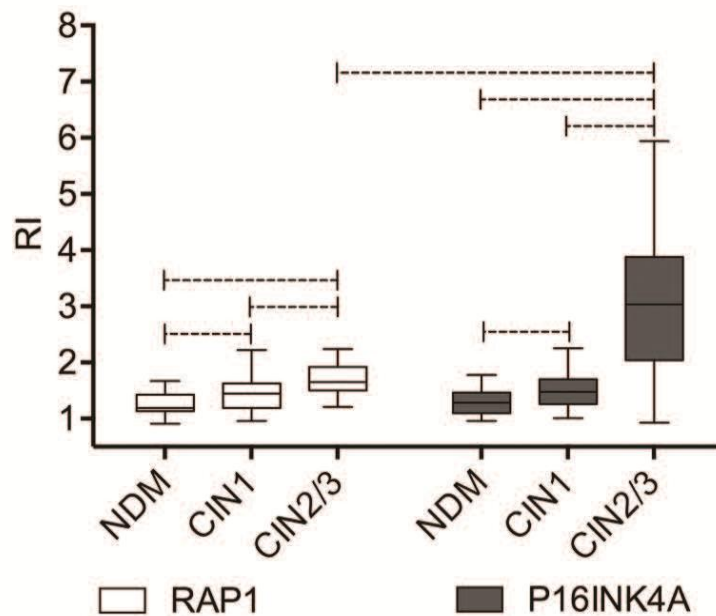


Fig 3. Morphometric analysis of RAP1 and p16^{INK4A} immunohistochemical staining. Relative Intensity (RI) data of RAP1 and p16^{INK4A} expression in NDM, CIN 1, and CIN 2/3 samples are expressed in box plot format, with boxes stretching from the 25th percentile to the 75th percentile and the line across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

doi:10.1371/journal.pone.0123531.g003

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

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

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

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

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

doi:10.1371/journal.pone.0123531.t002

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

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

Log-likelihood: -136.46

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

* Identifiability constraints proposed by Anderson [26].

doi:10.1371/journal.pone.0123531.t003

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

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

Discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

Supporting Information

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

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

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

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

(XLSX)

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

(XLSX)

Acknowledgments

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

Author Contributions

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

References

- zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:342–50. PMID: [12044010](#)
- Portari EA, Russomano FB, de Camargo MJ, Machado Gayer CR, da Rocha Gullobel HC, Santos-Rebouças CB, et al. Immunohistochemical Expression of Cyclin D1, p16(INK4a), p21WAF1, and Ki-67 correlates with the severity of cervical neoplasia. *Int J Gynecol Pathol*. 2013; 32:501–8. doi: [10.1097/PGP.0b013e31826f5c16](#) PMID: [23896712](#)
- Lobato S, Tafuri A, Fernandes PA, Caliani MV, Silva MX, Xavier MA, et al. Minichromosome maintenance 7 protein is a reliable biological marker for human cervical progressive disease. *J Gynecol Oncol*. 2012; 23:11–5. doi: [10.3802/jgo.2012.23.1.11](#) PMID: [22355461](#)
- von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M, Schmidt D, Bergeron C. (2012) Biomarkers for cervical cancer screening: the role of p16(INK4a) to highlight transforming HPV infections. *Expert Rev Proteomics*. 2012; 9:149–63. doi: [10.1586/epr.12.13](#) PMID: [22462787](#)
- Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, et al. p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2009; 35:210–20. doi: [10.1016/j.ctrv.2008.10.005](#) PMID: [19261387](#)
- Mendoza-Catalán MA, Cristóbal-Mondragón GR, Adame-Gómez J, del Valle-Flores HN, Coppe JF, Sierra-López L, et al. Nuclear expression of Rac1 in cervical premalignant lesions and cervical cancer cells. *BMC Cancer*. 2012; 12:116. doi: [10.1186/1471-2407-12-116](#) PMID: [22443139](#)
- Tibúrcio MG, Pinheiro NM, Carboni Sde S, Rocha LP, Adad SJ, Maluf PJ, et al. GTPases Rho distribution in intraepithelial and invasive neoplasias of the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2014; 35:284–8. PMID: [24984542](#)
- Gloerich M, Bos JL. Regulating Rap small G-proteins in time and space. *Trends Cell Biol*. 2011; 21:615–23. doi: [10.1016/j.tcb.2011.07.001](#) PMID: [21820312](#)
- Hattori M, Minato N. RAP1 GTPase: functions, regulation, and malignancy. *J Biochem*. 2003; 134:479–84. PMID: [14607972](#)
- Bos JL, de Rooij J, Reedquist KA. RAP1 signalling: adhering to new models. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2:369–77. PMID: [11331911](#)

11. Lafuente EM, Iwamoto Y, Carman CV, van Puijenbroek AA, Constantine E, Li L, et al. Active RAP1, a small GTPase that induces malignant transformation of hematopoietic progenitors, localizes in the nucleus and regulates protein expression. *Leuk Lymphoma*. 2007; 48:987–1002. PMID: [17487743](#)
12. Mitra RS, Zhang Z, Henson BS, Kurmit DM, Carey TE, D'Silva NJ. RAP1A and RAP1B ras-family proteins are prominently expressed in the nucleus of squamous carcinomas: nuclear translocation of GTP-bound active form. *Oncogene*. 2003; 22:6243–56. PMID: [13679863](#)
13. Banerjee R, Henson BS, Russo N, Tsodikov A, D'Silva NJ. RAP1 mediates galanin receptor 2-induced proliferation and survival in squamous cell carcinoma. *Cell Signal*. 2011; 23:1110–8. doi: [10.1016/j.cellsig.2011.02.002](#) PMID: [21345369](#)
14. Banerjee R, Russo N, Liu M, Van Tubergen E, D'Silva NJ. RAP1 and its regulatory proteins: the tumor suppressor, oncogene, tumor suppressor gene axis in head and neck cancer. *Small GTPases*. 2012; 3:192–7. doi: [10.4161/sgtp.20413](#) PMID: [22694501](#)
15. Nellore A, Paziana K, Ma C, Tsygankova OM, Wang Y, Puttaswamy K, et al. Loss of RAP1GAP in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94:1026–32. doi: [10.1210/jc.2008-1042](#) PMID: [19066305](#)
16. Furstenau DK, Mitra N, Wan F, Lewis R, Feldman MD, Fraker DL. Ras-related protein 1 and the insulin-like growth factor type I receptor are associated with risk of progression in patients diagnosed with carcinoma in situ. *Breast Cancer Res Treat*. 2011; 129:361–72. doi: [10.1007/s10549-010-1227-y](#) PMID: [20976540](#)
17. Kim WJ, Gersey Z, Daaka Y. RAP1GAP regulates renal cell carcinoma invasion. *Cancer Lett*. 2012; 320:65–71. doi: [10.1016/j.canlet.2012.01.022](#) PMID: [22266190](#)
18. Gao L, Feng Y, Bowers R, Becker-Hapak M, Gardner J, Council L, et al. Ras-associated protein-1 regulates extracellular signal-regulated kinase activation and migration in melanoma cells: two processes important to melanoma tumorigenesis and metastasis. *Cancer Res*. 2006; 66:7880–8. PMID: [16912161](#)
19. Gao Q, Srinivasan S, Boyer SN, Wazer DE, Band V. The E6 oncoproteins of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein, E6TP1, and target it for degradation. *Mol Cell Biol*. 1999; 19:733–44. PMID: [9858596](#)
20. Singh L, Gao Q, Kumar A, Gotoh T, Wazer DE, Band H, et al. The high-risk human papillomavirus type 16 E6 counters the GAP function of E6TP1 toward small Rap G proteins. *J Virol*. 2003; 77:1614–20. PMID: [12502878](#)
21. Farina A, Hattori M, Qin J, Nakatani Y, Minato N, Ozato K. Bromodomain protein Brd4 binds to GTPase-activating SPA-1, modulating its activity and subcellular localization. *Mol Cell Biol*. 2004; 24:9059–69. PMID: [15456879](#)
22. Husnjak K, Grce M, Magdić L, Pavelić K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods*. 2000; 88:125–34. PMID: [10960700](#)
23. Fuessel Haws AL, He Q, Rady PL, Zhang L, Grady J, Hughes TK, et al. Nested PCR with the PGM09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J Virol Methods*. 2004; 122:87–93. PMID: [15488625](#)
24. Nonogaki S, Wakamatsu A, Filho AL, Rotelli-Martins C, di Loreto C, Maeda MY, et al. Molecular strategies for identifying human papillomavirus infection in routinely processed samples: focus on paraffin sections. *J Low Genit Tract Dis*. 2005; 9:219–24. PMID: [16205192](#)
25. Galgano MT, Castle PE, Atkins KA, Brax WK, Nassau SR, Stoler MH. Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. *Am J Surg Pathol*. 2010; 34:1077–87. doi: [10.1097/PAS.0b013e3181e8b2c4](#) PMID: [20661011](#)
26. Anderson JA. Regression and ordered categorical variables. *J R Stat Soc*. 1984; 46:1–30.
27. Mazibrada J, Rittà M, Monclini M, De Andrea M, Azzimonti B, Borgogna C, et al. Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol*. 2008; 108:112–20. PMID: [17936343](#)
28. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*. 2001; 92:276–84. PMID: [11291057](#)
29. Goto M, Mitra RS, Liu M, Lee J, Henson BS, Carey T, et al. RAP1 stabilizes beta-catenin and enhances beta-catenin-dependent transcription and invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 2010; 16:65–76. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-09-1122](#) PMID: [20028760](#)
30. Ahn J, Mukherjee B, Banerjee M, Cooney KA. Bayesian inference for the stereotype regression model: Application to a case-control study of prostate cancer. *Stat Med*. 2009; 28:3139–57. doi: [10.1002/sim.3693](#) PMID: [19731262](#)

31. Abreu MN, Siqueira AL, Cardoso GS, Caiatta WT. Ordinal logistic regression models: application in quality of life studies. *Cad Saude Publica*. 2008; 24Suppl4:s581–91.
32. Schmid MC, Franco I, Kang SW, Hirsch E, Quilliam LA, Vamer JA. PI3-kinase γ promotes RAP1a-mediated activation of myeloid cell integrin $\alpha 4 \beta 1$, leading to tumor inflammation and growth. *PLoS One*. 2013; 8(4):e60226. doi: [10.1371/journal.pone.0060226](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060226) PMID: [23565202](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23565202/)
33. McPhillips MG, Oliveira JG, Spindler JE, Mitra R, McBride AA. Brd4 is required for E2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses. *J Virol*. 2006; 80:9530–43. PMID: [16973557](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16973557/)
34. McBride AA, McPhillips MG, Oliveira JG. Brd4: tethering, segregation and beyond. *Trends Microbiol*. 2004; 12:527–9. PMID: [15539109](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15539109/)
35. Yan J, Li Q, Lievens S, Tavemier J, You J. Abrogation of the Brd4-positive transcription elongation factor B complex by papillomavirus E2 protein contributes to viral oncogene repression. *J Virol*. 2010; 84:76–87. doi: [10.1128/JVI.01647-09](https://doi.org/10.1128/JVI.01647-09) PMID: [19846528](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19846528/)
36. Chakrabarti O, Veeraraghavalu K, Tergaonkar V, Liu Y, Androphy EJ, Stanley MA, et al. Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic Ras. *J Virol*. 2004; 78:5934–45. PMID: [15140991](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15140991/)

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akpolat I, Smith DA, Ramzy I, Chirala M, Mody DR. The Utility of p16INK4a and Ki-67 Staining on Cell Blocks Prepared from Residual Thin-Layer Cervicovaginal Material. *Cancer Cytopathol.* 2004;102:142–9.

Altschuler DL, Ribeiro Neto F. Mitogenic and oncogenic properties of the small G protein RAP1b. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; 95:7475–7479.

“ASC”US-LSIL Triage Study (ALTS) Group. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:1383-1392.

Badr RE, Walts AE, Chung F, Bose S. BD ProEx C: a sensitive and specific marker of HPV-associated squamous lesions of the cervix. *Am J Surg Pathol* 2008;32:899-906.

Banerjee R, Henson BS, Russo N, Tsodikov A, D'Silva NJ. RAP1 mediates galanin receptor 2-induced proliferation and survival in squamous cell carcinoma. *Cell Signal.* 2011; 23(7):1110-8.

Banerjee R, Russo N, Liu M, Van Tubergen E, D'Silva NJ. RAP1 and its regulatory proteins: the tumor suppressor, oncogene, tumor suppressor gene axis in head and neck cancer. *Small GTPases.* 2012; 3(3):192-7.

Bahnassy AA, Zekri AR, Saleh M. The possible role of cell cycle regulators in multistep process of HPV-associated cervical carcinoma. *BMC Clin Pathol.* 2007; 7: 4.

Barcelos AC, Michelin MA, Adad SJ, Murta EF. Atypical squamous cells of undetermined significance: Bethesda classification and association with Human Papillomavirus. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2011;2011:904674

Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol.* 2005 32 Suppl 1:S16-24.

Beranger F, Goud B, Tavitian A, de Gunzburg J. Association of the Ras-antagonistic Rap1/Krev-1 proteins with the Golgi complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:1606-1610

Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 2005 32 Suppl 1:S1-6.

Birukova AA, Meng F, Tian Y, Meliton A, Sarich N, Quilliam LA, Birukov KG. Prostacyclin post-treatment improves LPS-induced acute lung injury and endothelial barrier recovery via Rap1. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Dec 26;1852(5):778-791

Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends in microbiology* 2011; 19:33–39.

Bonanni P, Bechini A, Donato R, Capei R, Sacco C, Levi M, Boccalini S. Human papillomavirus vaccination: impact and recommendations across the world. *Ther Adv Vaccines.* 2015;3(1):3-12.

- Bos JL, Rooij J, Reedquist KA. RAP1 signalling: adhering to new models. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2(5):360-377.
- Buntinx F, Brouwers M. Relation between sampling device and detection of abnormality in cervical smears: a meta-analysis of randomised and quasi-randomised studies. *BMJ.* 1996;313:1285-90.
- Burchell AN, Winer RL, de Sanjose S, Franco EL. Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine.* 2006; 24 Suppl 3: S52-61.
- Burd, E.M. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews.* 2003; 16(1): 1–17.
- Byun S, Lee A, Kim S, Choi Y, Lee Y, Park J. Immunostaining of p16INK4a/Ki-67 and L1 Capsid Protein on Liquid-based Cytology Specimens Obtained from ASC-H and LSIL-H Cases. *Int. J. Med. Sci.* 2013;10.
- Caetano R, Vianna CMM, Thuler LCS, Girianelli VR. Custo-efetividade no diagnóstico precoce do câncer de colo uterino no Brasil. *Physis: Rev Saúde Coletiva* 2006; 16 (1): 99-118.
- Carvalho Nde O, del Castillo DM, Perone C, Januário JN, Melo VH, Brasileiro Filho G. Comparison of HPV genotyping by type-specific PCR and sequencing. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105 (1):73-8.
- Castellsagué X, Muñoz N, Pitisuttithum P, Ferris D, Monsonogo J, Ault K, Luna J, Myers E, Mallary S, Bautista OM, Bryan J, Vuocolo S, Haupt RM, Saah A. End-of-study safety, immunogenicity, and efficacy of quadrivalent HPV (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine in adult women 24-45 years of age. *Br J Cancer.* 2011;105(1):28-3
- Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008;110(3 Suppl 2):S4-7
- Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* 2002;89(2):191-9.
- Castle PE, Carreon JD. Practice improvement in cervical screening and management: symposium on management of cervical abnormalities in adolescents and young women *J Low Genit Tract Dis.* 2010;14:238-240; author reply 240.
- Castle PE, Rodríguez AC, Burk RD, Herrero R, Wacholder S, Alfaro M, Morales J, Guillen D, Sherman ME, Solomon D, Schiffman M; Proyecto Epidemiológico Guanacaste (PEG) Group. Short term persistence of human papillomavirus and risk of cervical precancer and cancer: population based cohort study. *BMJ.* 2009;339:b2569.
- Chakrabarti O, Krishna S. Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *J Biosci.* 2003; 28(3):337-48.
- Chen Y, Miller C, Mosher R, Zhao X, Deeds J, Morrissey M, Bryant B, Yang D, Meyer R, Cronin F, Gostout BS, Smith-McCune K, Schlegel R. Identification of cervical cancer markers by cDNA and tissue microarrays. *Cancer Res.* 2003;63(8):1927-35

Claeys P, Broutet N, Ullrich A. Comprehensive cervical cancer control: a guide to essential practice. World Health Organization, Geneva, 2006.
(http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144785/1/9789241548953_eng.pdf?ua=1)

Conesa-Zamora P, Doménech-peris A, Ortiz-Reina S. Immunohistochemical evaluation of ProEx C in human papillomavirus-induced lesions of the cervix. *J Clin Pathol*. 2009; 62: 159-62.

Conesa-Zamora P. Role of Cell Cycle Biomarkers in Human Papillomavirus Related Uterine Lesions. *Current Pharmaceutical Design*. 2013; 19(8):1412-24

Cox, J. T. Management of women with cervical cytology interpreted as ASC-US or as ASC-H. *Clin Obstet Gynecol*, v. 48, n. 1, p. 160-177, 2005.

Crapanzano JP, Heymann JJ, Monaco S, Nassar A, Saqi A. The state of cell block variation and satisfaction in the era of molecular diagnostics and personalized medicine. *Cytojournal*. 2014 Mar 20;11:7.

Crittenden JR, Bergmeier W, Zhang Y, Piffath CL, Liang Y, Wagner DD et al. CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation. *Nat. Med*. 2004; 10:982–986.

Crothers BA. The Bethesda System 2001: update on terminology and application. *Clin Obstet Gynecol*. 2005; 48(1): 98-107.

Crum CP. Symposium part 1: Should the Bethesda System terminology be used in diagnostic surgical pathology? *Point. Int J Gynecol Pathol*. 2003; 22(1): 5-12.

Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 Oct;17(10):2536-45.

de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*. 2010;11:1048-1056.

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

Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero / Instituto Nacional de Câncer - Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica. – Rio de Janeiro: INCA, 2011.
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/rastreamento_cancer_colo_uterio.pdf

Doeberitz M von K. New markers for cervical dysplasia to visualize the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *European J Cancer* 2002;38: 2229-2242.

Dona MG, Vocaturo A, Giuliani M. p16/Ki-67 dual staining in cervicovaginal cytology: correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *Gynecol Oncol*. 2012; 126: 198-202.

- Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006;110(5):525-41.
- Doorbar J. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Dis Markers*. 2007; 23(4):297-313.
- Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005; 32 Suppl 1: S7-15.
- Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, Markowitz LE. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA*. 2007;297(8):813-9.
- Dorn A, Zoellner A, Follo M, Martin S, Weber F, Marks R, Melchinger W, Zeiser R, Fisch P, Scheele JS. Rap1a deficiency modifies cytokine responses and MAPK-signaling in vitro and impairs the in vivo inflammatory response. *Cell Immunol*. 2012 Mar-Apr;276(1-2):187-95.
- D'Silva NJ, Mitra RS, Zhang Z, Kurnit DM, Babcock CR, Polverini PJ, Carey TE. RAP1, a small GTPbinding protein is upregulated during arrest of proliferation in human keratinocytes. *J Cell Physiol*. 2003; 196(3):532-40
- Duchniewicz M, Zemojtel T, Kolanczyk M, Grossmann S, Scheele JS, Zwartkuis FJ. rRAP1A-deficient T and B cells show impaired integrin-mediated cell adhesion. *Mol. Cell. Biol*. 2006;26:643–653.
- Dyson N, Howley P, Munger K, Harlow E. The human papillomavirus- 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989;243:934–937.
- Farina A, Hattori M, Qin J, Nakatanl Y, Minato N, Ozato K. Bromo domain protein Brd4 binds to GTPase-activating SPA-1, modulating its activity and subcellular localization. *Mol Cell Biol*. 2004; 24(20): 9059-69.
- Ferenczy, A.; Franco, E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncology*. 2002;3:11-16.
- Fernandes JV, Meissner R de V, de Carvalho MG, Fernandes TA, de Azevedo PR, Villa LL. Prevalence of HPV infection by cervical cytologic status in Brazil. *Int J Gynecol Obstet* 2009;105(1):21–4.
- Franke B, Akkerman JW, Bos JL. Rapid Ca²⁺-mediated activation of Rap1 in human platelets. *EMBO J* 1997; 16(2):252-259.
- Frazer, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature Reviews Immunology*. 2004; 4(1)46-54.
- Freitas C, Milanezi F, Dias AJ, Bento MJ, Schmitt FC. Use of Cell Block Preparation for Morphological, Immunocytochemistry, and Ploidy Analysis in ThinPrepT Monolayer Preparations. *Diagnostic Cytopathology*. 2001; 25 (6) 415-416.
- Frische EW, Zwartkuis FJ. RAP1, a mercenary among the Ras-like GTPases. *Dev Biol*. 2010; 340(1):1-9.

Fuessel Haws AL, He Q, Rady PL, Zhang L, Grady J, Hughes TK, Stisser K, Konig R, Tyring SK. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J Virol Methods*. 2004 ;122(1):87-93.

Furstenau DK, Mitra N, Wan F, Lewis R, Feldman MD, Fraker DL, Guvakova MA. Ras-related protein 1 and the insulin-like growth factor type I receptor are associated with risk of progression in patients diagnosed with carcinoma in situ. *Breast Cancer Res Treat*. 2011; 129(2): 361-72.

Gao L, Feng Y, Bowers R, Becker-Hapak M, Gardner J, Council L, Linette G, Zhao H, Cornelius LA. Ras-associated protein-1 regulates extracellular signal-regulated kinase activation and migration in melanoma cells: two processes important to melanoma tumorigenesis and metastasis. *Cancer Res*. 2006; 66(16):7880-8.

Gilmer LS. Human Papillomavirus Vaccine Update. *Prim Care*. 2015;42(1):17-32.

Giroglou T, Florin L, Schäfer F, Streeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol*. 2001;75(3):1565-70.

Gloerich M, Bos JL. Regulating Rap small G-proteins in time and space. *Trends Cell Biol*. 2011; 21(10):615-23.

Gravitt PE, Peyton CL, Alessi T. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(1): 357–361.

Gravitt PE, Jamshidi R. Diagnosis and management of oncogenic cervical human papillomavirus infection. *Infect Dis Clin North Am*. 2005;19(2): 439-58.

Guo Z, Yuan J, Tang W, Chen X, Gu X, Luo K, Wang Y, Wan B, Yu L. Cloning and characterization of the human gene RAP2C, a novel member of Ras family, which activates transcriptional activities of SRE. *Mol Biol Rep*. 2007 Sep;34(3):137-44.

Halloush RA, Akpolat I, Zhai QJ, Schwartz MR, Mody DR. Comparison of ProEx C With p16INK4a and Ki-67 Immunohistochemical Staining of Cell Blocks Prepared From Residual Liquid-based Cervicovaginal Material. *Cancer Cytopathology*. 2008;114:474–80.

Hattori M, Minato N. RAP1 GTPase: functions, regulation, and malignancy. *J Biochem*. 2003; 134(4):479-84

Husnjak K, Grce M, Magdic L, Pavelic K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods*. 2000; 88(2):125-34

Hogan C, Serpente N, Cogram P, Hosking CR, Bialucha CU, Feller SM et al. RAP1 regulates the formation of E-cadherin-based cell–cell contacts. *Mol. Cell. Biol*. 2004;24:6690–6700

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.

Huitron S, Bonvicino A, Fadare O. Patients with negative cervical biopsies after papanicolaou test interpretations of "atypical squamous cells, cannot exclude high-

grade squamous intraepithelial lesion": comparative longitudinal follow-up. *Ann Diagn Pathol.* 2008;12(3):187-90.

IARC- WHO International Agency for research on cancer – World health Organization. <http://screening.iarc.fr/cervicalindex.php> acessado em 10 de março de 2015.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Brasil. 2014. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>

Jain D, Mathur SR, Iyer VK. Cell blocks in cytopathology: a review of preparative methods, utility in diagnosis and role in ancillary studies. *Cytopathology.* 2014 Dec;25(6):356-71

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

Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets.* 2007; 7(1):79-89.

Katagiri K, Hattori M, Minato N, Irie S, Takatsu K, Kinashi T. RAP1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Mol. Cell. Biol.* 2000; 20:1956–1969.

Kasamatsu E, Cubilla AL, Alemany L, Chaux A, Tous S, Mendoza L, Paez M, Klaustermeier JE, Quint W, Lloveras B, de Sanjose S, Muñoz N, Bosch FX. Type-specific human papillomavirus distribution in invasive cervical carcinomas in Paraguay. A study of 432 cases. *J Med Virol.* 2012 Oct;84(10):1628-35.

Keyhani-Rofagha S, Vesey-Shecket M. Diagnostic value, feasibility, and validity of preparing cell blocks from fluid-based gynecologic cytology specimens. *Cancer.* 2002 Aug 25;96(4):204-9.

Kim WJ, Gersey Z, Daaka Y. RAP1GAP regulates renal cell carcinoma invasion. *Cancer Lett.* 2012; 320(1):65-71

Kisser A, Zechmeister-Koss I. A systematic review of p16/Ki-67 immuno-testing for triage of low grade cervical cytology. *BJOG.* 2015;122:64–70

Kitayama H, Sugimoto Y, Matsuzaki T, Ikawa Y, Noda M. A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* 1989;56(1): 77–84.

Kjaer SK, Frederiksen K, Munk C, Iftner T. Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102:1478–88.

Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, Harlow E: Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature.* 1995; 375:506–510

Koo YJ, Hahn HS, Lee IH, Lim KT, Lee KH, Kim HS, Kim TJ, Chun YK, Kim HS, Hong SR. Dual immunostaining of cervical cytology specimens with atypical squamous cells for p16/Ki-67 does not exclude the existence of a high-grade squamous intraepithelial lesion. *Virchows Arch.* 2013 Nov;463(5):689-96.

Kometani K, Ishida D, Hattori M, Minato N. Rap1 and SPA-1 in hematologic malignancy. *Trends Mol Med*. 2004 Aug;10(8):401-8.

Kossakowski CA, Morresi-Hauf A, Schnabel PA, Eberhardt R, Herth FJ, Warth A. Preparation of cell blocks for lung cancer diagnosis and prediction: protocol and experience of a high-volume center. *Respiration*. 2014;87(5):432-8.

Kruger AM, Stevens MW, Kerley KJ, Carter CD. Comparison of the Cellient™ automated cell block system and agar cell block method. *Cytopathology*. 2014 Dec;25(6):381-8.

Kulasingam S, Havrilesky L, Ghebre R, et al. Screening for Cervical Cancer: A Decision Analysis for the US Preventive Services Task Force. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality; 2011. AHRQ Pub. No. 11-05157- EF-1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92546/pdf/TOC.pdf>

Lafuente EM, Iwamoto Y, Carman CV, van Puijenbroek AA, Constantine E, Li L, Boussiotis VA. Active Rap1, a small GTPase that induces malignant transformation of hematopoietic progenitors, localizes in the nucleus and regulates protein expression. *Leuk Lymphoma*. 2007; 48(5): 987-1002.

Lee JO, Russo AA, Pavletich NP. Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature*. 1998;391(6670):859-65.

Lee C, Wooldridge TR, Laimins LA. Analysis of the roles of E6 binding to E6TP1 and nuclear localization in the human papillomavirus type 31 life cycle. *Virology*. 2007; 358(1):201-10.

Leykauf K, Salek M, Schlüter H, Lehmann WD, Alonso A. Identification of membrane proteins differentially expressed in human papillomavirus type 16 E5-transfected human keratinocytes by nanoelectrospray ionization mass spectrometry. *J Gen Virol*. 2004; 85(Pt 6):1427-31.

Li Y, Nichols M, Shay J, Xiong Y. Transcriptional repression of the D-type cyclin dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res*. 1994; 54:6078–6082.

Lie AK, Kristensen G. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as a predictive marker for cervical carcinoma. *Expert Rev Mol Diagn*. 2008;8(4):405-15

Lima, D. N. O.; Câmara, S.; Mattos, M. G. G.; Ramalho, R. Diagnóstico citológico de ASCUS: sua importância na conduta clínica. *J Bras Pat Med Laboratorial*, v. 38, n. 1, p. 45-49, 2002.

Linxweiler M, Bochen F, Wemmert S, Lerner C, Hasenfus A, Bohle RM, Al-Kadah B, Takacs ZF, Smola S, Schick B. Combination of p16(INK4a) -Ki67 immunocytology and hpv polymerase chain reaction for the noninvasive analysis of HPV involvement in head and neck cancer. *Cancer Cytopathol*. 2014 Dec 29

Litjens RJ, Hopman AH, van de Vijver KK, Ramaekers FC, Kruitwagen RF, Kruse AJ. Molecular biomarkers in cervical cancer diagnosis: a critical appraisal. *Expert Opin Med Diagn*. 2013;7(4):365-77.

Lobato S, Tafuri A, Fernandes PÁ, Caliari MV, Silva MX, Xavier MA, Vago AR. Minichromosome maintenance 7 protein is a reliable biological marker for human cervical progressive disease. *J Gynecol Oncol*. 2012; 23(1):11-5.

Loghavi S, Walts AE, Bose S. CINtec® PLUS dual immunostain: a triage tool for cervical pap smears with atypical squamous cells of undetermined significance and low grade squamous intraepithelial lesion. *Diagn Cytopathol*. 2013 Jul;41(7):582-7.

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

Malinowski DP. Multiple biomarkers in molecular oncology. I. Molecular diagnostics applications in cervical cancer detection. *Expert Rev Mol Diagn* 2007;7:117-31.

Maridonneau PI, de Gunzburg J. Association of rap1 and rap2 proteins with the specific granules of human neutrophils. Translocation to the plasma membrane during cell activation. *J Biol Chem* 1992; 267:6396-6402.

McBride AA, Oliveira JG, McPhillips MG. Partitioning viral genomes in mitosis:same idea, different targets. *Cell Cycle*. 2006;5(14):1499-502.

McCredie MR, Sharples KJ, Paul C, et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol*. 2008;9:425-434.

McPhillips MG, Oliveira JG, Spindler JE, Mitra R, McBride AA. Brd4 is required for e2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses. *J Virol*. 2006 Oct;80(19):9530-43.

Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol*. 1976 Nov-Dec;20(6):505-9.

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; 77(19):10186-201.

Miguel, N. L.; Lachowicz, C. M.; Kline, T. S. Candida-related changes and ASCUS: a potencial trap! *Diagn Cytopathol*, v. 16, n. 1, p. 83-86, 1996

Ministério da Saúde 2015 (acessado em 10 de março de 2015)
<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/16959-sus-oferta-vacina-contrahpv-para-meninas-de-9-a-11-anos>

Mitra RS, Zhang Z, Henson BS, Kurnit DM, Carey TE, D'Silva NJ. Rap1A and rap1B ras-family proteins are prominently expressed in the nucleus of squamous carcinomas: nuclear translocation of GTP-bound active form. *Oncogene*. 2003; 22(40): 6243-56.

Mitra RS, Goto M, Lee JS, Maldonado D, Taylor JM, Pan Q et al. Rap1GAP promotes invasion via induction of matrix metalloproteinase 9 secretion, which is associated with poor survival in low N-stage squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2008; 68(10):3959-69.

Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010;10 (8):550-60.

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.

Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*. 2004;78(21):11451-60..

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348(6): 518-27.

Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S3/1-10.

Nellore A, Paziana K, Ma C, Tsygankova OM, Wang Y, Puttaswamy K, Iqbal AU, Franks SR, Lv Y, Troxel AB, Feldman MD, Meinkoth JL, Brose MS. Loss of RAP1GAP in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94(3):1026-32.

Oliveira JG, Colf LA, McBride AA. Variations in the association of papillomavirus E2 proteins with mitotic chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(4):1047-52.

Paesi S, Correa L, Tregnago MC, Mandelli J, Roesch-Ely M. Human papillomavirus among women with atypical squamous cells of undetermined significance in southern Brazil. *Int J Gynaecol Obstet*. 2015;128 (1):23-6

Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S3/11-25.

Pascoal-Xavier MA. Avaliação do padrão de expressão das proteínas Rap1GTPase e p16 em lesões intra-epiteliais cervicais associadas à infecção por papilomavírus humano. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.

Pascoal-Xavier MA. Expressão e caracterização da proteína RAP1 como biomarcador da neoplasia intraepitelial cervical associada à infecção por papilomavírus humano. Belo Horizonte. Tese [Doutorado em Ciências na área de Ciências Biológicas] - Universidade Federal de Minas Gerais; 2011.

Pascoal-Xavier MA, Figueiredo ACC, Gomes LI, Peruhype-Magalhães, Calzavara-Silva CA, Costa MA, Reis IA, Bonjardim CA, Kroon EG, Oliveira JG, Ferreira PCP. RAP1 GTPase overexpression is associated with cervical intraepithelial neoplasia. *Plos One* (aceito para publicação)

Peyton CL, Gravitt PE, Hunt WC, Hundley RS, Zhao M, Apple RJ, Wheeler CM. Determinants of genital human papillomavirus detection in a US population. *J Infect Dis*. 2001;183(11):1554-64

Pizon V, Desjardins M, Bucci C, Parton RG, Zerial, M. Association of Rap1 and Rap1b proteins with late endocytic/phagocytic compartments and Rap2a with the Golgi complex. *J. Cell Sci*. 1994; 107:1661–1670.

Plummer M, Schiffman M, Castle PE, et al; ALTS Group. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis.* 2007;195:1582- 1589.

Price LS, Hajdo-Milasinovic A, Zhao J, Zwartkuis FJ, Collard JG, Bos JL. Rap1 regulates E-cadherin mediated cell–cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 2004;279:35127–35132.

Poon MW, Yan L, Jiang D, Qin P, Tse HF, Wong IY, Wong DS, Tergaonkar V, Lian Q. Inhibition of RAP1 Enhances Corneal Recovery Following Alkali Injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015 Jan 8;56(2):711-21.

Portari EA, Russomano FB, de Camargo MJ, Machado Gayer CR, da Rocha Guillobel HC, Santos-Rebouças CB, Brito Macedo JM. Immunohistochemical expression of cyclin D1, p16Ink4a, p21WAF1, and Ki-67 correlates with the severity of cervical neoplasia. *Int J Gynecol Pathol.* 2013 Sep;32(5):501-8

Qiao X, Bhuiya TA, Spitzer M. Differentiating highgrade cervical intraepithelial lesion from atrophy in postmenopausal women using Ki-67, cyclin E, and p16 immunohistochemical analysis. *J Low Genit Tract Dis.* 2005; 9: 100-107.

Qiu T, Qi X, Cen J, Chen Z. RAP1GAP alters leukemia cell differentiation, apoptosis and invasion in vitro. *Oncol Rep.* 2012; 28(2):622-8.

Quinn MT, Mullen MX, Jesaitis AJ, Linner JG, Quinn MT, Jesaitis AJ et al. Subcellular distribution of the Rap1A protein in human neutrophils: colocalization and cotranslocation with cytochrome b559. *Blood* 1992; 79:1563-1573.

Ravarino A, Nemolato S, Macciocu E, Fraschini M, Senes G, Faa G, Negri G. CINtec PLUS immunocytochemistry as a tool for the cytologic diagnosis of glandular lesions of the cervix uteri. *Am J Clin Pathol.* 2012 Nov;138(5):652-6

Reedquist KA, Ross E, Koop EA, Wolthuis RM, Zwartkuis FJ, van Kooyk Y, et al. The small GTPase, Rap1, mediates CD31- induced integrin adhesion. *J. Cell. Biol.* 2000;148:1151–1158.

Ridder R, Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, Bogers J, Dachez R, Denton K, Hariri J, Keller T, Doeberitz M, Neumann H, Puigintore L, Sideri M, Rehm S. Screening for Cervical Cancer Precursors With p16/Ki-67 Dual-Stained Cytology: Results of the PALMS Study. *J Natl Cancer Inst.* 2013; 105: 1550–1557.

Solomon, D; Nayar, R. Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal. Revinter, 2005. 192p

Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, Castle PE, Solomon D, Burk R; Proyecto Epidemiológico Guanacaste Group. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100 (7):513-7.

Roelens J, Reuschenbach M, Doeberitz MVK, Wentzensen N, Bergeron C, Arbyn M. p16INK4a Immunocytochemistry Versus Human Papillomavirus Testing for Triage of Women With Minor Cytologic Abnormalities. *Cancer Cytopathology.* 2012; 120:294-307

Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L, Mazo A, Lleonart ME, Castellvi J, Ramon Y Cajal S p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors.. *Oncogene*. 2011 May 5;30(18):2087-97

Rosseti, M. L.; Silva, C. M. D.; Rodrigues, J. J. S. Doenças Infecciosas – Diagnóstico Molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

Sanclemente G, Gill DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2002;16(3):231-40.

Sanguinetti CJ, Dias-Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 1994, 17(5): 914-921.

Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol*. 1998;153(6):1741-8.

Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Int*. 1998;48:580–585

Santin AD, Zhan F, Bignotti E, Siegel ER, Cané S, Bellone S, Palmieri M, Anfossi S, Thomas M, Burnett A, Kay HH, Roman JJ, O'Brien TJ, Tian E, Cannon MJ, Shaughnessy J Jr, Pecorelli S. Gene expression profiles of primary HPV16- and HPV18-infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy. *Virology*. 2005;331(2):269-91.

Santopietro R, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Zakharova T, Pajanidi J, Podistov J, Chemeris G, Sozaeva L, Lipova E, Tsidaeva I, Ivanchenko O, Pshepurko A, Zakharenko S, Nerovjna R, Kljukina L, Erokhina O, Branovskaja M, Nikitina M, Grunberga V, Grunberg A, Juschenko A, Cintonino M, Tosi P, Syrjanen K, Syrjanen S. Cell cycle regulators p105, p107, Rb2/p130, E2F4, p21CIP1/WAF1, cyclin A in predicting cervical intraepithelial neoplasia, high-risk human papillomavirus infections and their outcome in women screened in three new independent states of the former Soviet Union. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006; 15(7): 1250-6.

Sarian LO, Derchain SF, Yoshida A, Vassallo J, Pignataro F, Angelo Andrade LA. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and Ki67 as related to disease severity and HPV detection in squamous lesions of the cervix. *Gynecol Oncol*. 2006; 102: 537-41.

Sarian LO, Derchain SF, Yoshida A, Vassallo J, Pignataro F, DE Angelo Andrade LA. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and Ki67 as related to disease severity and HPV detection in squamous lesions of the cervix. *Gynecol Oncol*. 2006; 102: 537-41.

Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J, Garcia FA, Moriarty AT, Waxman AG, Wilbur DC, Wentzensen N, Downs LS Jr, Spitzer M, Moscicki AB, Franco EL, Stoler MH, Schiffman M, Castle PE, Myers ER; ACS-ASCCP-ASCP Cervical Cancer Guideline Committee. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *CA Cancer J Clin*. 2012;62(3):147-72.

Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain JM. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *J Low Genit Tract Dis.* 2012;16(3):175-204

Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer.* 2005;15 (5): 727-46.

Schiffman M, Kjaer SK. Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003; 31: 14-9.

Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2007; 370(9590): 890-907.

Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, Kinney W, Gage JC, Castle PE. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(5):368-83

Schmid MC, Franco I, Kang SW, Hirsch E, Quilliam LA, Varner JA. PI3-kinase γ promotes Rap1a-mediated activation of myeloid cell integrin $\alpha 4\beta 1$, leading to tumor inflammation and growth. *PLoS One.* 2013;8(4):e60226.

Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R; European CINtec Cytology Study Group. p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer Cytopathol.* 2011 Jun 25;119(3):158-66

Serrano M, Hannon GJ, Beach D: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* 1993; 366:704–707

Shidham VB, Mehrotra R, Varsegi G, D'Amore KL, Hunt B, Narayan R. p16 immunocytochemistry on cell blocks as an adjunct to cervical cytology: Potential reflex testing on specially prepared cell blocks from residual liquid-based cytology specimens. *Cytojournal* 2011; 8:1

Shimonaka M, Katagiri K, Nakayama T, Fujita N, Tsuruo T, Yoshie O, Kinashi T. Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J. Cell. Biol.* 2003; 161:417–427.

Silva-Filho AL, Traiman P, Triginelli SA. Expression of p53, Ki-67, and CD31 in the vaginal margins of radical hysterectomy in patients with stage IB carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol.* 2004; 95: 646-654.

Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science.* 2006; 314(5797):268-74

Smith JA, White EA, Sowa ME, Powell ML, Ottinger M, Harper JW, Howley PM. Genome-wide siRNA screen identifies SMCX, EP400, and Brd4 as E2-dependent regulators of human papillomavirus oncogene expression *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Feb 23;107(8):3752-7

Singh L, Gao Q, Kumar A, Gotoh T, Wazer DE, Band H, Feig LA, Band V. The high-risk human papillomavirus type 16 E6 counters the GAP function of E6TP1 toward small Rap G proteins. *J Virol.* 2003 Jan;77(2):1614-20.

Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'connor D, Prey M, Raab S, Sherman, M, Wilbur D, Wright T JR, Young N. Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002;287(16): 2114-9.

Souza, J. H. K.; Kalil, I. V.; Leite, J. M.; Geber, S. Avaliação de lâminas de colpocitologia oncótica previamente diagnosticadas como ASCUS: comparação interensaio e interobservadores. *Rev Bras de Ginecol e Obstet*, v. 26, n. 3, p. 233-240, 2004.

Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol*. 2007;107(2 Suppl 1):S2-5.

Stout NK, Goldhaber-Fiebert JD, Ortendahl JD, Goldie SJ. Trade-offs in cervical cancer prevention: balancing benefits and risks. *Arch Intern Med*. 2008;168(17):1881-9.

Tambouret RH. The evolution of the Papanicolaou smear. *Clin Obstet Gynecol*. 2013;56(1):3-9.

Thomison J III, 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.

Toll AD, Kelly D, Maleki Z. Utility of P16 expression and Ki-67 proliferation index in ASCUS and ASC-H pap tests. *Diagn Cytopathol*. 2014 Jul;42(7):576-81

Torti M, Lapetina EG. Role of rap1B and p21ras GTPase-activating protein in the regulation of phospholipase C-gamma 1 in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(16):7796-800.

Trottier H, Franco EL. Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention. *Am J Manag Care*. 2006;12(17 Suppl):S462-72.

Trunk MJ, Dallenbach-Hellweg G, Ridder R, Petry KU, Ikenberg H, Schneider V, von Knebel Doeberitz M. Morphologic characteristics of p16INK4a-positive cells in cervical cytology samples. *Acta Cytol*. 2004;48(6):771-82.

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

Tsukamoto N, Hattori M, Yang H, Bos JL, Minato N. Rap1 GTPase-activating protein SPA-1 negatively regulates cell adhesion. *J. Biol. Chem*. 1999;274:18463–18469.

Tsygankova OM, Prendergast GV, Puttaswamy K, Wang Y, Feldman MD, Wang H, et al. Downregulation of Rap1GAP contributes to Ras transformation. *Mol Cell Biol*. 2007;27(19):6647-58.

Villa, L.L. Biology of genital human papillomaviruses. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2006; 94, Suppl 1 (S3-S7).

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189(1):12-9

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

Wang X, Gu D, Lou B, Xu B, Qian F, Chen Y. Hospital-based prevalence of high-risk cervical HPV types infecting the general population and female sex workers in Huzhou, China. *Int J Gynaecol Obstet.* 2013 Jan;120(1):37-41.

Yeoh GPS, Chan KW. Cell Block Preparation on Residual ThinPrep Sample. *Diagnostic Cytopathology.* 1999; 21:427–431.

Yoshida T, Sano T, Kanuma T, Inoue H, Itoh T, Yazaki C, Obara M, Fukuda T. Usefulness of CINtec® PLUS p16/Ki-67 double-staining in cytological screening of cervical cancer. *Acta Cytol.* 2011;55(5):413-20.

Yoshida T, Iwata T, Takai Y, Birchmeier W, Yamato M, Okano T. Afdin requirement for cytokine expressions in keratinocytes during chemically induced inflammation in mice. *Genes Cells.* 2014 Nov;19(11):842-52

Zehbe I, Wilander E. Two consensus primer systems and nested polymerase chain reaction for human papillomavirus detection in cervical biopsies: A study of sensitivity. *Hum Pathol.* 1996; 27(8): 812-5.

Zhang Z, Mitra RS, Henson BS, Datta NS, McCauley LK, Kumar P et al. Rap1GAP inhibits tumor growth in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Am J Pathol.* 2006;168(2):585-96.

Zhang G, Yang B, Abdul-Karim FW. p16 Immunohistochemistry is Useful in Confirming High-grade Squamous Intraepithelial Lesions (HSIL) in Women With Negative HPV Testing. *Int J Gynecol Pathol.* 2015 Mar;34(2):180-6.

Zheng H, Gao L, Feng Y, Yuan L, Zhao H, Cornelius LA. Down-regulation of Rap1GAP via promoter hypermethylation promotes melanoma cell proliferation, survival, and migration. *Cancer Res.* 2009; 69(2):449-57.

zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1288(2):F55-78.

zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology* 2009; 384:260–265.

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

Zuo H, Gandhi M, Edreira MM, Hochbaum D, Nimgaonkar VL, Zhang P et al. Downregulation of Rap1GAP through epigenetic silencing and loss of heterozygosity promotes invasion and progression of thyroid tumors. *Cancer Res.* 2010; 70(4):1389-97.