

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

Talita Helena Araújo de Oliveira

**Avaliação e correlação do perfil de expressão do
oncogene E5 do papilomavírus humano e do miRNA-
203 do hospedeiro na carcinogênese cervical**

Recife

2016

Talita Helena Araújo de Oliveira

**Avaliação e correlação do perfil de expressão do
oncogene E5 do papilomavírus humano e do miRNA-
203 do hospedeiro na carcinogênese cervical**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Co-orientadoras: Dra. Maria da Conceição Gomes Leitão

Dra. Eliane Campos Coimbra

Recife

2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Oliveira, Talita Helena Araújo de

Avaliação e correlação do perfil de expressão do oncogene E5 do papilomavírus humano e do miRNA-203 do hospedeiro na carcinogênese cervical / Talita Helena Araújo de Oliveira. – Recife: O Autor, 2016.

85 f.: il.

Orientadores: Antônio Carlos de Freitas, Maria da Conceição Gomes Leitão, Eliane Campos Coimbra

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, 2016.

Inclui referências, anexos e apêndices

1. Colo uterino – Câncer 2. Papilomavírus 3. Expressão genética I. Freitas, Antônio Carlos de (orient.) II. Leitão, Maria da Conceição Gomes (coorient.) III. Coimbra, Eliane Campos (coorient.) IV. Título.

Talita Helena Araújo de Oliveira

**Avaliação e correlação do perfil de expressão do oncogene E5
do papilomavírus humano e do miRNA-203 do hospedeiro na
carcinogênese cervical**

Aprovado em 07/03/2016

Banca Examinadora:

Dr. Antonio Carlos de Freitas

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Maria Tereza Cartaxo Muniz

Universidade de Pernambuco

Dr. Moacyr Jesus Barreto De Melo Rêgo

Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2016

Agradecimentos

Agradeço especialmente ao meu orientador, professor Dr. Antônio Carlos de Freitas, e as minhas co-orientadoras, Dra. Maria da Conceição Gomes Leitão e Dra. Eliane Campos Coimbra pelos ensinamentos e conhecimento passados.

Aos meus pais que sempre me apoiam e aconselham com muita paciência e carinho.

Aos integrantes do Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental – LEMTE, pelo auxílio, amizade e apoio durante todo o tempo de desenvolvimento do projeto.

A FACEPE e ao CNPq que forneceram os subsídios financeiros para que este projeto pudesse ser concretizado.

Resumo

O HPV é o principal fator transformador do câncer cervical. No seu ciclo viral é expressa a oncoproteína E5, responsável por várias alterações na célula hospedeira e, foi sugerido *in vitro*, que ela altera a proliferação celular através da regulação negativa do microRNA-203, que em condições normais atua inibindo a proliferação e condicionando a diferenciação dos queratinócitos. Entretanto os mecanismos que envolvem E5 e o microRNA-203 ainda não estão bem elucidados. Este estudo tem como objetivo avaliar o perfil de expressão da oncoproteína E5 e do microRNA-203 em biópsias de colo uterino, observando a existência de correlação entre ambos. A expressão gênica relativa do microRNA-203 e E5 nas amostras clínicas (n=90), referente a todas as etapas da carcinogênese cervical (Normal, NIC I, NIC II, NIC III e câncer), foi obtida por qPCR. As análises mostraram uma diminuição do perfil de expressão do microRNA-203 no câncer em comparação com amostras normais ($p < 0,01$) enquanto o RNAm de E5 do HPV 16 aumentou sua expressão em NIC III e no câncer em relação a lesões de baixo grau (NIC I) ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente). Os resultados apontam que o microRNA-203 está regulado negativamente no câncer cervical, porém sem correlação estatisticamente significativa com a expressão de E5. O perfil apresentado nos diferentes estágios sugere que o microRNA-203 e o oncogene E5 são capazes de diferenciar estágios da carcinogênese cervical.

Palavras-chaves: Expressão Gênica; HPV; Neoplasia intraepitelial cervical.

Abstract

The Human papillomavirus (HPV) is the main transforming factor in cervical cancer. The HPV expresses the oncoprotein E5 which is responsible for several changes in the host cells and recent *in vitro* studies have suggested that it plays a role in the regulation of cell proliferation through microRNA-203. This microRNA acts by inhibiting cell proliferation and stimulating cell differentiation in normal conditions. However, the mechanisms involving E5 and microRNA-203 are not yet well elucidated. The aim of the present study is to evaluate both E5 and microRNA-203 expression profiles in biopsies of women from Pernambuco and observe if there is any correlations between them. Expression of microRNA-203 in clinical samples (n=90), observed at all carcinogenic process (Normal, CIN I, CIN II, CIN III and cancer), was obtained by real-time qPCR. The analysis here performed demonstrates a decreased expression of microRNA-203 in cancer samples when compared to the normal ones ($p < 0,01$) while E5 increased its expression in CIN III and cancer when compared to low-grad lesion (CIN I) ($p < 0,001$ and $p < 0,01$, respectively). Our data shows that miR-203 is downregulated in cancer, although no statistical significant correlation was found between its expression and E5. Both expression profiles suggest their ability to differentiate lesions.

Key-words: Gene expression; HPV; Cervical intraepithelial neoplasia.

Lista de Ilustrações

Figura 1:	Infecção pelo HPV e progressão da lesão.	Página 15
Figura 2:	Genoma do HPV.	Página 16
Figura 3:	Eletoforese em gel de agarose a 1 % do produto de PCR convencional para detecção do genoma viral.	Página 29
Figura 4:	Eletoforese em gel de agarose 2,5% do produto da PCR da genotipagem do HPV 16.	Página 29
Figura 5:	Eletoforese em gel de agarose 2% do produto de PCR do gene da β - globina humana.	Página 30
Figura 6:	Padrão de bandas para controle de qualidade do RNA.	Página 31
Figura 7:	Curva de eficiência dos primers para o microRNA-203.	Página 32
Figura 8:	Curva de eficiência dos primers para os genes de referência.	Página 32
Figura 9:	Curvas de eficiência dos primers para E5 do HPV 16, 18, 31, 33 e 58.	Página 34
Figura 10:	Curvas de melting do microRNA-203, E5 e genes de referência.	Página 35
Figura 11:	Expressão do MicroRNA-203 ao longo da carcinogênese cervical.	Página 37
Figura 12:	Expressão relativa de E5 do HPV 18 e 33 ao longo da carcinogênese cervical.	Página 38
Figura 13:	Expressão relativa de E5 do HPV 58 ao longo da carcinogênese cervical.	Página 39
Figura 14:	Expressão relativa de E5 do HPV 31 ao longo da carcinogênese cervical.	Página 40
Figura 15:	Expressão relativa de E5 do HPV 16 ao longo da carcinogênese cervical.	Página 41

Lista de Tabelas

Tabela 1:	MicroRNAs envolvidos no desenvolvimento do câncer cervical modulados por oncoproteínas.	Página 16
Tabela 2:	Sequência dos primers para detecção do HPV e avaliação da integridade do DNA utilizado.	Página 23
Tabela 3:	Informações dos primers utilizados para genotipagem do HPV.	Página 24
Tabela 4:	Primers desenhados para amplificação em qPCR.	Página 27
Tabela 5:	Resultado das genotipagens.	Página 30
Tabela 6:	Resultados dos parâmetros da curva padrão em qPCR dos pares de primers.	Página 34
Tabela 7:	Valores do coeficiente de correlação entre os perfis de expressão de E5 do HPV 31 e do miR-203 nos grupos amostrais pelo teste de Spearman.	Página 42
Tabela 8:	Valores do coeficiente de correlação entre os perfis de expressão de E5 do HPV 16 e do miR-203 nos grupos amostrais pelo teste de Spearman.	Página 42
Tabela 9:	Perfil de expressão do miR-203 nos diferentes tipos de câncer.	Página 44
Tabela 10:	Perfil de expressão do miR-203 no câncer cervical.	Página 45
Tabela 11:	Hipóteses sobre a diminuição do perfil de expressão do mir-203 no câncer cervical.	Página 49

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.

DSTs	Doenças sexualmente transmissíveis
HPV	Papilomavírus humano
miR	MicroRNA
miRNA	MicroRNA
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NIC 1	Neoplasia intraepitelial cervical de grau 1
NIC 2	Neoplasia intraepitelial cervical de grau 2
NIC 3	Neoplasia intraepitelial cervical de grau 3
LSIL	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
HSIL	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
TCLE	Termo de consentimento Livre e esclarecido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Ct	Ciclo de threshold
ACTB	Gene da Beta-actina
GAPDH	Gliceraldeídesidrogenase 3-fosfato
HIV	Vírus da imunodeficiência humana

Sumário

1.	Introdução	11
2.	Revisão de literatura.....	13
2.1.	Câncer cervical e HPV	13
2.2.	Oncoproteínas virais e o câncer cervical	15
2.3.	Oncoproteína E5	17
2.4.	Avaliação de microRNAs na carcinogênese.....	18
2.5.	MicroRNA-203.....	19
2.6.	Interação entre a oncoproteína E5 e o miR-203.....	20
3.	Objetivos	21
3.1.	Objetivo Geral	21
3.2.	Objetivos específicos	21
4.	Material e métodos.....	21
4.1.	Obtenção das amostras clínicas	21
4.2.	Extração do DNA para detecção e genotipagem do HPV.....	22
4.3.	Detecção e genotipagem dos HPVs.....	22
4.4.	Extração de RNA total e Síntese do cDNA.....	24
4.5.	Avaliação da expressão do oncogene E5 e do miR-203por qPCR	25
4.6.	Normalização dos resultados da qPCR de E5e miR-203	27
4.7.	Análise estatística	28
5.	Resultados Obtidos	28
5.1.	Detecção e genotipagem	28
5.2.	Avaliação da eficiência dos primers para qPCR.....	31
5.3.	Perfil de Expressão do miR-203.....	36
5.4.	Perfil de expressão do oncogene E5	37
5.5.	Correlação entre os perfis de expressão do miR-203 e do oncogene E5	41
6.	Discussão.....	42

6.1.	Expressão do miR-203.....	42
6.2.	Expressão do oncogene E5	49
6.3.	Correlação do perfil de expressão do oncogene E5 e do miR-203.....	52
7.	Conclusões	54
8.	Referências Bibliográficas.....	55
9.	Apêndice	62
10.	Anexo I	65
11.	Anexo II	66

1. Introdução

De acordo com o Ministério da Saúde, são linhas prioritárias as pesquisas que visem aumentar a qualidade e expectativa de vida da população, entre essas prioridades se encontram as DSTs (Doenças sexualmente transmissíveis) e o câncer de colo de útero. A infecção por HPVs (Papiloma vírus humano) de alto risco está diretamente relacionada com o desenvolvimento do câncer de colo de útero, e a infecção por HPV é, hoje, caracterizada como uma das principais DSTs que afligem a população mundial. Cerca de 291 milhões de mulheres no mundo são portadoras de HPV com 265 mil mortes por este tipo de câncer ao ano. No Brasil, o câncer de colo de útero produz uma média de 2,5 óbitos/100.000 indivíduos, com a média do nordeste superior a nacional, com Pernambuco igual a 2,9/100.000 indivíduos. Apesar do alto número de mulheres infectadas, a maioria não desenvolve lesão e tem a capacidade de espontaneamente expulsar o vírus das células infectadas. Porém, mesmo com alta taxa de remissão, cerca de 5% das mulheres infectadas desenvolvem lesões que podem levar a formação do câncer de colo de útero e ao óbito.

Neste contexto a implantação de estratégias efetivas para a detecção do vírus e lesões cervicais faz parte de um conjunto de políticas públicas voltadas à Atenção Básica, do Ministério da Saúde. Desta forma, com o objetivo de encontrar estratégias eficazes, genes são estudados como possíveis biomarcadores para a detecção precoce de alterações celulares causadas pelo HPV, bem como para a precisa diferenciação dos níveis de lesão cervical. Entre estes genes estão alguns envolvidas na regulação do ciclo celular, microRNAs (miR) do hospedeiro e também oncoproteínas virais.

O microRNA-203 é um importante alvo de estudo sobre a carcinogênese do câncer cervical, particularmente por ser específico de células epiteliais e ter sua expressão alterada em diversos tipos de câncer. Além do miR-203 temos a oncoproteína E5 do HPV como alvo de estudo, que está relacionada a progressão tumoral e, recentemente, foi sugerido *in vitro* o seu envolvimento em alterações na expressão do miR-203.

Com base nos dados acima, este estudo contribuirá para a caracterização do perfil molecular relacionado ao câncer cervical, tentando esclarecer mecanismos que induzem a carcinogênese.

2. Revisão de literatura

2.1. Câncer cervical e HPV

O câncer cervical é uma das principais causas de morte por câncer em mulheres no mundo, com 87% dos casos ocorrendo nos países em desenvolvimento (Frazer, I.H. 2004; Botezatu, A. *et al.*, 2011). No Brasil foram estimados 15.590 casos de câncer cervical para o período de 2014, com incidência de ~ 19/ 100 mil indivíduos no Nordeste (INCA, 2014), e 16.340 casos para o ano de 2016 (INCA, 2016) representando um desafio ao Sistema Único de Saúde.

A prevenção do câncer cervical é potencialmente eficaz, uma vez que apresenta evolução lenta, desde o desenvolvimento das lesões precursoras, neoplasia intraepitelial de grau 1, 2 e 3 (NIC I, NIC II e NIC III, respectivamente), até a neoplasia maligna (Steenbergen, R. D. M. *et al.*, 2005); contudo, o exame citológico, que é a principal estratégia de rastreamento utilizada, e o histopatológico que é o padrão-ouro utilizado no diagnóstico, na maioria das vezes induzem à variações na interpretação das atipias celulares, resultando em diagnósticos inconsistentes (Amaral, R.G. *et al.*, 2008).

Várias evidências experimentais sustentam a estreita correlação entre a infecção por alguns tipos específicos de papiloma vírus humano (HPV) e a etiologia do câncer ano-genital (zur Hausen, H. 2002), em especial o carcinoma cervical, para o qual o HPV-16 está presente em 60-70% dos casos (Bernard, H.U. *et al.*, 2010). No Nordeste os tipos de HPV mais prevalentes em lesões cervicais, além do HPV 16, são o HPV 18, HPV 31, HPV 33 e HPV 58 (Gurgel, A.P. *et al.*, 2015). Tendo em vista a relação viral com o câncer cervical alguns países têm adotado junto ao exame citológico, a detecção do HPV por captura híbrida II, no entanto apesar da

alta sensibilidade o teste apresenta especificidade reduzida, pois pode detectar HPVs de baixo risco oncogênico que frequentemente estão presentes, e não permite o diagnóstico e prognóstico exato para cada tipo de lesão (Derchain, S.F.M. et al ., 2005).

O HPV é transmitido através de relações sexuais (vaginal, oral e/ou anal) onde aproveitam a presença de micro traumas na mucosa para alcançar as células basais (Sapp, M. and Bienkowska-Haba, M. 2009). A partir da infecção o vírus pode ser expulso do organismo antes de causar lesão, pode levar a formação de lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL), NIC I, e de alto grau (HSIL) ou pode gerar uma infecção persistente com integração do genoma viral no genoma do hospedeiro, que é uma etapa importante para a formação do câncer cervical (Woodman C.B. et al., 2007) (Figura 1). As ações virais visam a modulação da proliferação, apoptose e da resposta imune do hospedeiro, tanto a inata como a adaptativa, sendo a celular o principal tipo de resposta imune responsável contra a infecção pelo HPV. Nas infecções persistentes a resposta imune celular é inibida, o que contribui para o não reconhecimento do vírus pelo organismo hospedeiro (Yu, S.L. et al 2012).

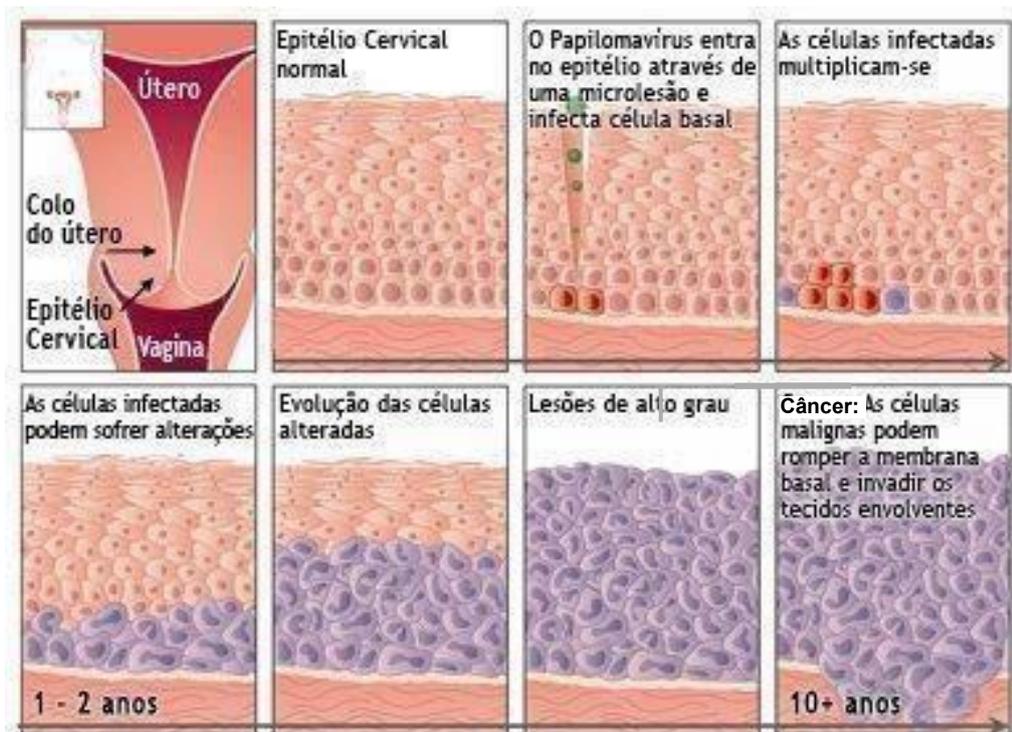


Figura 1. Infecção pelo HPV e progressão da lesão – O esquema mostra a infecção viral, desde a entrada do vírus na célula hospedeira até a formação do câncer cervical. A partir da entrada do vírus nos queratinócitos, se não houver atividade eficaz do sistema imune, a partícula viral irá se replicar e infectar as células adjacentes. A persistência da infecção promove a progressão de lesões de baixo grau (LSIL), NIC I (neoplasia intraepitelial cervical de grau I), para lesões de alto grau (HSIL), NIC II (neoplasia intraepitelial cervical de grau II) e NIC III (neoplasia intraepitelial cervical de grau III), e destas para a formação do câncer. (Fonte: Alexandre Pereira de Sousa, 2011)

2.2. Oncoproteínas virais e o câncercervical

Os oncogenes E5, E6 e E7 são essenciais na promoção da desordem celular e transformação em células malignas, que culminará no aparecimento de carcinomas, agindo tanto individualmente (Hu, L., and Ceresa, B. P., 2009) quanto em conjunto, quando as propriedades carcinogênicas se tornam potencializadas. Tais genes apresentam uma vasta gama de interações com proteínas reguladoras do ciclo celular, da proliferação e diferenciação, como também diversas outras proteínas celulares, o que induz instabilidades genéticas. Tais oncoproteínas (Figura 2) também apresentam ações sobre os microRNAs da célula hospedeira (Tabela 1),

que regulam a expressão de diversos genes importantes no processo carcinogênico e ajudam a esconder a presença do vírus da resposta imune do hospedeiro (McBride, A. A et al., 2012). Todas as oncoproteínas desempenham papéis essenciais na formação das lesões cervicais, porém a oncoproteína E5 possui suas atividades e vias carcinogênicas pouco elucidadas, necessitando principalmente de estudos *in vivo* para maiores esclarecimentos.

Tabela 1. MicroRNAs modulados por oncoproteínas envolvidas no desenvolvimento do câncer cervical. (Fonte: modificada de Pedroza-Torres A et al., 2014)

Oncoproteína	Regulação	MicroRNAs
E5	Positiva	miR-146a
E5	Negativa	miR-324-5p; miR-203
E6	Negativa	miR-34a, miR-218, miR-23b
E6	Negativa	miR-203
E6/E7	Negativa	miR-29
E7	Negativa	miR-15b, miR-15a, miR-16-1, miR-203

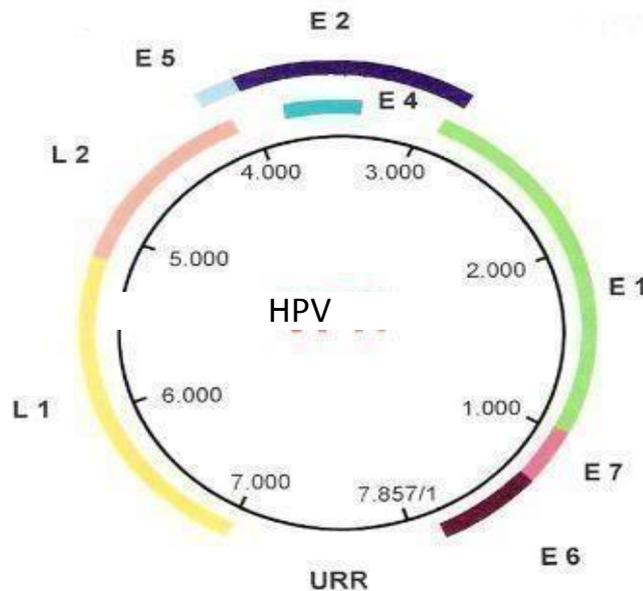


Figura 2. Genoma do HPV – A imagem mostra os genes que codificam proteínas precoces (E1- E7) e tardias (L1 e L2) do HPV. A região de L1, envolvida na formação do capsídeo viral, é a utilizada para detecção do vírus por ser uma região bem conservada. (FONTE: Muñoz N, et al. 2006).

2.3. Oncoproteína E5

Dentre as oncoproteínas, E5 é uma molécula com partes hidrofóbicas que pode ser encontrada na membrana plasmática, na membrana nuclear, no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático (Miura S et al., 2010; Borzacchiello G et al., 2010). Durante a infecção persistente do HPV ocorre a integração viral no genoma hospedeiro, e segundo parte da literatura o oncogene E5 é perdido na maioria dos casos (Muto V et al., 2011; Fehrmann, F, and Laimins LA, 2003), restringindo seu potencial na progressão da lesão cervical aos estágios precoces da infecção (Araibi, E. H. et al., 2004; Ashrafi, G. H. et al., 2006; Gruener, M. et al., 2007). Discordando do proposto por esses autores, outros trabalhos mostraram que o oncogene E5 permaneceu sendo expresso na célula hospedeira após a integração viral, de forma episomal, em parte dos casos estudados (Chang, J.L. et al. 2001; Häfner, N. et al. 2008; Lorenzon, L. et al, 2011).

E5 atua como mediador da transformação oncogênica através de várias vias, como por exemplo através do VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) (Moody and Laimins, 2010). Liao, S. et al. (2013) trouxe evidências do papel de E5 na promoção da proliferação, migração e invasão de células cancerígenas *in vitro*, e acelera o crescimento de tumores derivados do câncer cervical *in vivo*. Trabalhos anteriores em cultura de queratinócitos humanos também mostraram que E5 altera a expressão de vários genes codificantes de proteínas envolvidas na motilidade e adesão celular, o que poderia explicar porque células cancerígenas expressando E5 tem um aumento da motilidade (Kivi N. et al.,2008).

2.4. Avaliação de microRNAs na carcinogênese

A análise de variações nos níveis de expressão de RNAm (Rosty, C. *et al.*, 2005; Chao, A. *et al.* 2006; Wong, Y.F *et al.*, 2006; Sheng, J. and Zhang Wei-yuan, 2010; Rajkumar, T. *et al.*, 2011; Pinto, A.P. *et al.*, 2010) e microRNAs (Lee, J.W. *et al.*, 2008; Wang, X. *et al.*, 2009; Hu, X. *et al.*, 2010; Pereira, A.P. *et al.*, 2010; Rao, Q. *et al.*, 2012), na carcinogênese cervical vem sendo o foco de muitos estudos para a identificação de possíveis biomarcadores e alvos terapêuticos que aumentem a acurácia dos testes preventivos atuais e tonem o tratamento mais eficaz.

Os microRNAs são RNAs de fita simples com tamanho variando de 19 a 24 nucleotídeos, que são transcritos e maturados para exercer sua função biológica na regulação pós-transcricional de genes que codificam proteínas (Ling H. *et al.*, 2013), com grande importância também na regulação de genes durante infecções virais (Roberts, A.P. and Jopling, C.L., 2010). Além disso, são tecido-específico e possuem um perfil de expressão característico nos tecidos normais, porém são encontrados com expressão alterada no câncer, sugerindo envolvimento no processo carcinogênico e apontando a importância de seu estudo. Por regular a expressão de vários genes, os microRNAs estão envolvidos n'a proliferação, diferenciação e apoptose, e podem facilitar ou dificultar o desenvolvimento de neoplasias, inclusive no tecido cervical. Dentre os microRNAs estudados, o miRNA-203 tem apresentado um perfil de expressão alterado em vários processos neoplásicos, e principalmente no câncer cervical, podendo ser uma alternativa para diagnóstico, prognóstico e terapia para este tipo de câncer (Esquela-Kerscher A. and Slack F. J., 2006).

2.5. MicroRNA-203

O miR-203 está localizado no cromossomo 14q32 e foi sugerido como potencial biomarcador em vários tipos de câncer por apresentar alterações em sua expressão. Ele atua como supressor tumoral em várias neoplasias humanas devido a inibição direta de produtos gênicos como Δ Np63, AKT2, Src, Runx2 e ABL 1 (Ørom U.A. et al., 2012; Yu H. et al., 2012). Zhang, F. et al (2014) mostrou o efeito anti-tumoral do miR-203, que ao ser induzido a super expressão no câncer esofageal inibiu o miR-21, reconhecidamente um miR pro-oncogênico inibidor da apoptose, através da repressão de proteínas Ran. Estudos encontraram o miR-203 regulado negativamente no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de laringe, linfoma de células B, em processos malignos hematopoiéticos, câncer de colón, câncer de próstata, melanoma e glioma, (Jianguo, H.E. et al., 2013). Em contraste, o miR-203 foi encontrado aumentado no carcinoma endometrial (Chung, T.K. et al., 2009) e em adenocarcinoma pancreático, onde foi apontado como um marcador de mau prognóstico (Ikenaga N. et al., 2010),

O miR-203 é específico de tecido epitelial e apresenta extrema importância no controle da proliferação, principalmente através da inibição da proteína Δ Np63 que é um estimulador da proliferação celular, para dar início a diferenciação de queratinócitos (McKenna, J.D. et al. 2010). A expressão do miR-203 em tecidos normais aumenta de acordo com a diferenciação das células, ou seja, das camadas basais para as camadas mais superficiais (Sonkoly E. et al., 2007; Wei T. et al., 2010).

Adicionalmente, alguns trabalhos têm revelado que o perfil aberrante de alguns miRNAs, dentre os quais está o miR-203, nas neoplasias cervicais está associado à

ação das oncoproteínas E5, E6 e E7 do HPV, com finalidade de manter a célula em estado ideal para a manutenção do genoma viral e progressão da lesão cervical (Greco, D. et al, 2011; Shen Y. et al., 2011; Reshmi and Pillai 2012).

2.6. Interação entre a oncoproteína E5 e omiR-203

Em estudos para avaliar a expressão e interação de microRNAs e da oncoproteína E5, Greco, D. et al. (2011) mostrou, *in vitro*, que células expressando E5 apresentaram a expressão de microRNAs alterada, incluindo o miR-203 que foi regulado negativamente como uma possível via de repressão da diferenciação celular. É apontado na literatura que a alta expressão do miR-203 teria ação inibitória na amplificação do genoma viral já que este evento ocorre preferencialmente em células jovens, ainda não diferenciadas, e por isso seria esperada uma alteração da sua expressão para manter a amplificação do HPV (Melar-New and Laimins, 2010). Apesar das várias análises, a oncoproteína E5 ainda não tem seus mecanismos biológicos bem definidos e são necessários mais estudos, *in vivo*, a respeito das vias e alvos desta proteína.

Portanto, de acordo com o exposto, é importante a caracterização do perfil de expressão da oncoproteína E5 do HPV e do miR-203 do hospedeiro em amostras clínicas, assim como da correlação de ambos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar e correlacionar o perfil de expressão do oncogene E5 do HPV e do miR-203 de pacientes, nas amostras clínicas, nos diferentes tipos de lesões cervicais (amostras normais, NIC I, NIC II, NIC III e câncer).

3.2. Objetivos específicos

- Detectar o HPV e genotipar as amostras para os HPVs: 16, 18, 31, 33 e 58;
- Obter os níveis de expressão relativa de E5 e do miR-203 e correlaciona-los, nas amostras normais, NIC I, NIC II, NIC III e câncer;

4. Material e métodos

4.1. Obtenção das amostras clínicas

Foi realizado um estudo transversal com 90 biópsias cervicais de mulheres, com idade variando de 18 a 70 anos, apresentando os vários graus da lesão cervical, NIC I (n=17), NIC II (n=19), NIC III (n=20) e o câncer (n=14). As biópsias foram coletadas em solução de RNA *later* (Qiagen) e em seguida congeladas a -80° C até o procedimento de extração. Foram incluídas no estudo amostras controles do tecido cervical normal (sem lesão) (n= 20).

O estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE (CAAE: 03606212.7.0000.5208) (Anexo 2).

As pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice I), e responderam a um questionário que aborda dados socioeconômicos, hábitos e estado emocional/ psicológico. As pacientes foram provenientes do serviço de rotina do atendimento ginecológico, do Instituto de Medicina Integral Prof.

Fernando Figueira (IMIP), do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e do Hospital Barão de Lucena, e foram incluídas no estudo as mulheres maiores de 18 anos. Não foram incluídas no estudo, pacientes positivas para o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e/ ou mulheres com deficiências que as impediam de compreender o estudo.

4.2. Extração do DNA para detecção e genotipagem do HPV

O DNA das biopsias foi extraído e purificado através do procedimento de maceração com nitrogênio líquido em solução de *TRizol® Reagent* (Invitrogen), foi feita a maceração com 1ml de Trizol, em seguida foi adicionado 200µl de clorofórmio e homogeneizado por 15 segundos, incubado por 3 min à temperatura ambiente e centrifugado a 14000rpm por 15min à 4°C; Removemos a fase aquosa e seguimos o protocolo do kit *DNAesy® tissue and blood DNA extraction* (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. Depois de extraído, o DNA foi armazenado a -20°C.

4.3. Detecção e genotipagem dos HPVs

A detecção do DNA dos HPVs 16, 18, 31, 33 e 58 foi efetuada pela técnica *Polimerase Chain Reaction* (PCR), utilizando-se *primers* consenso e degenerados (MY09/MY11), que amplificam uma sequência de 455pb na região L1 do genoma do HPV (Figura 2), conforme descrito por Kay *et al.* (2002). Como controle da integridade do DNA extraído, a amplificação do gene da β -globina humana foi realizada, utilizando os *primers* PC04 e GH20 que gera um amplicon com 110 pb (Karlsen *et al.*, 1996; da Silva, B. *et al.*, 2009) (Tabela 2). As condições de

amplificação dos fragmentos foram efetuadas de acordo com o protocolo desenvolvido por da Silva, B. *et al.*(2009).

Tabela 2. Sequência dos primers para detecção do HPV e avaliação da integridade do DNA utilizado.

Primer	Sequência	Amplicon
MY09	5'-GCACAGGGTCATAACAATGG-3'	455 pb
MY11	5'-GATCAATATCCCCTTGGACG-3'	
PC04	5' -ACACAACGTGTTCACATA- 3'	110 pb
GH20	5'-GGTGAACGTGGATGAAGTTG-3'	

Para genotipagem dos tipos de HPV foram desenhados primers específicos através do software CLCbio Main Workbench versão 5.7.1 (QUIAGEN), observando os parâmetros de tamanho dos primers, tamanho do amplicon gerado, conteúdo de CG nas extremidades 5' e 3', temperatura de melting, possibilidade de anelamento entre os pares de primer, formação de estrutura secundária e especificidade, testada *in silico*. Todos os primers foram padronizados nas amostras clínicas para garantir especificidade e ótima eficiência, validando a temperatura de anelamento ideal. A genotipagem dos HPVs foi realizada por meio de PCR convencional, onde o volume final da reação foi 25µl, contendo: 12,5µl de Master Mix (Qiagen), 2µl de cada primer, 7,5µl de água sem nuclease e 1µl de DNA. As condições de amplificação para o HPV 16, 18, 33 e 58 foram: 95°C por 3 min, seguidos de 30 ciclos a 95°C por 15 segundos, 1 min com a temperatura específica de anelamento para cada par de primer (tabela 3) e extensão a 72°C por 1min. As condições para o HPV 31 foram: 94°C por 2 min, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 10 segundos, 20 segundos a 55°C, 72°C por 1min e extensão final a 72°C por 5min.

Os primers para genotipagem, detecção do HPV e para avaliação da integridade do DNA foram padronizados para obtenção de ótima eficiência e especificidade (Bustin *et al.*, 2009).

Todos os produtos de PCR convencional foram avaliados por eletroforese em gel de agarose com concentrações variando de 1% a 2,5% dependendo do tamanho da sequência amplificada, utilizando TAE 1x (Solução de estoque: TAE 10x – Tris base 400mM, ácido acético 190mM e EDTA 10mM pH 7.6). Foi adicionada ao gel uma solução de brometo de etídeo (0.5µg/ml) para visualização das bandas de DNA através de transluminador de luz ultravioleta. As bandas foram visualizadas utilizando como referencial o marcador DNA step ladder (Promega) que variou de 50pb a 1kb, dependendo do tamanho do amplicon gerado na PCR.

Tabela 3. Informações dos primers utilizados para genotipagem do HPV.

Primers	Sequência	Amplicon	Temperatura de anelamento
HPV 16	F:AGCTCAGAGGAGGAGGATGA R:GAGAACAGATGGGGCACAAC	199 pb	60°C
HPV 18	F:CAACACGGCGACCCTACAA R:AGCATGGGGTATACTGTCTCT	170 pb	52,5°C
HPV 31	F:CGTTTTCGGTTACAGTTTTACAAG C R:AGCTGGACTGTCTATGACAT	728 pb	55°C
HPV 33	F:ACTGAGGAAAAACCACGAACA R:GATAAGAACCGCAAACACAGT	200 pb	61°C
HPV 58	F:GAAATAGGCTTGGACGGGC R:GTTTCGTACGTCGGTTGTTGT	131 pb	60°C

4.4. Extração de RNA total e Síntese do cDNA

O RNA total das amostras clínicas foi extraído através do procedimento de maceração com nitrogênio líquido em solução de *TRIzol® Reagent* (Invitrogen), foi feita a maceração com 1ml de Trizol, em seguida foi adicionado 200µl de clorofórmio e homogeneizado por 15 segundos, incubado por 3 min à temperatura ambiente e centrifugado a 14000rpm por 15min à 4°C; e purificado com o *Absolutely RNA miRNA Kit* (Agilent Technologies), conforme as instruções do fabricante. Este *Kit*

permite a recuperação tanto de microRNA quanto de RNA mensageiro, possibilitando a avaliação da expressão de ambos, a partir de uma mesma amostra.

A integridade do RNA foi assegurada pela observação das bandas de RNA ribossomal (28S e 18S), por eletroforese em gel de agarose 1% (0,4g) com 7,25ml de formaldeído 37%, 4ml de MOPS 10x, 28,75ml de água com DEPC e 4µl de brometo de etídeo. Foi preparado um mix de desnaturação para aplicação contendo 3µl de RNA, 2µl de MOPS 10x, 3,5µl de formaldeído e 10µl de formamida; 2µl de loading RNA buffer (0,1ml de EDTA, 4,9ml de água, 5ml de glicerol) foi aplicado com as amostras. Também foi avaliada a concentração e pureza do RNA pelo NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoScientific), com critério de inclusão 260/280 (1.8-2.1) e concentração de RNA a partir de 100ng/µl.

A síntese dos cDNA foi realizada com *input* de 1000ng do RNA total em um volume final de reação com 20µl, através do *miScript II RT kit* (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. Para cada amostra foi adicionado um tubo para o controle de contaminação com DNA genômico, sem a enzima transcriptase reversa.

4.5. Avaliação da expressão do oncogene E5 e do miR-203 por qPCR

Os primers para quantificação dos miRNAs, miR-203 e miRNAs de referência, foram adquiridos comercialmente do *miScript Primer Assay Kit* (Qiagen). Os microRNAs de referência para normalização do miRNA-203 foram o miR-191 e o miR-23a (Pereira et al, 2010; Peltier e latham, 2008; Shen et al, 2011; Leitao et al, 2014).

As qPCRs para o miR-203, o miR-191 e miR-23a foram realizadas com o *miScript Sybr Green kit* (Qiagen), de acordo com recomendações do fabricante, e executada no *Rotor-Gene 6000 Real-Time Rotary Analyzer* (Corbett Life Science). Todas as reações consistiram em um volume final de 20 µl contendo: 10 µl de SYBR® Green PCR Master Mix (QIAGEN), 2 µl de primer forward, 2 µl de primer reverso, 2 µl de cDNA e 4 µl de água sem nuclease. As condições de amplificação do miR-203, miR-191 e miR-23a foram: desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguidos de 35 ciclos a 55°C por 30 segundos e 70°C por 30 segundos para anelamento e extensão, com extensão final a 72°C por 1 min.

Para cada par de primer (para E5, miR-203 e genes de referência) (Tabela 4) foi realizada uma curva padrão de eficiência em qPCR, para avaliar a eficiência dos primers e da reação, com triplicatas de diluições na base 10 (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000, 1:100.000) de um cDNA padrão de tecido normal para o miRNA-203 e genes de referência, e um cDNA de amostra positiva para E5 de cada tipo de HPV. Os valores de Ct médios para cada diluição em série foram traçados em função do logaritmo do fator da diluição do cDNA. A eficiência de amplificação para cada par foi calculada pelo método da curva padrão, utilizando a fórmula: $\text{Eficiência} = (10^{-1/\text{declive}} - 1) \times 100$. A curva de melting foi obtida para confirmar a especificidade dos primers (Anexo III).

A concentração final de cDNA utilizada para as reações de qPCR foram de 20ng/µl para RNAm (E5, GAPDH e ACTB) e de 2ng/µl para microRNA (miR-203, miR-191 e miR-23a).

Para avaliar a expressão gênica de E5 foi realizada a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), com os *primers* específicos desenhados para cada um dos tipos

de HPV. Os dois genes de referência apontados como mais estáveis (Leitão et al., 2014), GAPDH e ACTB, foram utilizados para normalizar a expressão de E5 de todos os HPVs em todas as amostras. As reações de qPCRs para os genes de referência consistiram em um volume final de 20 µl contendo: 10 µl de SYBR® Green PCR Master Mix (QIAGEN), 2 µl de primer forward, 2 µl de primer reverso, 2 µl de cDNA e 4 µl de água sem nuclease. As condições de amplificação foram: 95°C por 15 min, seguidos de 30 ciclos a 95°C por 25 segundos, 60°C por 25 segundos e 72°C for 25 segundos, com extensão final a 72°C por 2 min.

Tabela 4. Primers desenhados para amplificação em qPCR.

Alvos	Sequência dos primers	Amplicon	Temperatura de anelamento
ACTB	F: TCGAGC AAGAGATGGCCAC R: GGAAGGAAGGCTGGAAGAGT	132pb	60°C
GAPDH	F: GAAGGCTGGGGTCATTTG R: TAAGCAGTTGGTGGTGCAGG	91pb	60°C
E5 HPV 16	F: ACT GGCTGCTTTTTGCTTTG R:GACACAGACAAAAGCAGCGG	93 pb	60°C
E5 HPV 18	F:CGCTTTTGCCATCTGTCTGT R:ACACAAATACCAATACCCATGC	54 pb	58°C
E5 HPV 31	F: GCTGTCTGTGTCGGTATAT R: AAAACAACGTAATGGAGAGG	82 pb	53°C
E5 HPV 33	F:CTATGCTTGGTTGCTGGTGT R:GAGATCCCACAAACACCCAAA	53 pb	61°C
E5 HPV 58	F:GGGTCGGCTCTACGAATTTT R:CTTGTGGGTTAAGTATTGTGC	94pb	61°C

4.6. Normalização dos resultados da qPCR de E5 e miR-203

Os genes de referência foram validados previamente em tecido cervical e utilizados na obtenção dos níveis de expressão do RNAm de E5 e do microRNA-203 (Leitão et al., 2014). Assim, o Δct dos genes de referência e alvos foram obtidos ($\Delta ct = Ct \text{ médio do alvo} - Ct \text{ médio de cada amostra}$) e para cada amostra foi alcançado um “Quantite” Relativo ($=eficiência^{\Delta ct}$) dos genes de referência e do gene alvo para cada amostra (Hellemans et al., 2007). Em seguida, o “quantite” relativo do alvo foi

dividido pela média geométrica dos “quantites” relativos dos genes de referência, calculado por amostra para obter a expressão relativa de cada amostra. Foram utilizados os genes GAPDH e ACTB para normalização do RNAm de E5 e os miR-191 e 23a para normalização do miR-203.

4.7. Análise estatística

Os dados de expressão relativa foram avaliados quanto à distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk. A diferença de expressão relativa entre os grupos amostrais (normal, NIC1, NIC 2, NIC 3 e câncer) foram verificados pelo teste de Kruskal-wallis e o Pós-teste de comparação múltipla de Dunn. O teste de correlação de Spearman foi aplicado para avaliar a correlação entre as expressões de E5 e do miR-203, com resultados de coeficiente de correlação entre 1 e -1. Os resultados foram considerados significantes com $p < 0,05$. Os softwares utilizados para realização dos testes foram o GraphPad Prism 5.01 e Stata/SE 12.0.

5. Resultados Obtidos

5.1. Detecção e genotipagem

As amostras foram testadas quanto à presença do HPV (Figura 3) e foram genotipadas para os cinco tipos de HPVs mais frequentes em nossa população: HPV16, HPV18, HPV31, HPV33 e HPV58 (Figura 4). Todas as amostras foram testadas quanto a sua qualidade para serem usadas em reação de PCR pela amplificação do gene da β - globina humana (figura 5) e todas foram consideradas de qualidade, assim como todas as amostras com lesão foram positivas para a presença do HPV (n=70) (Tabela 5).

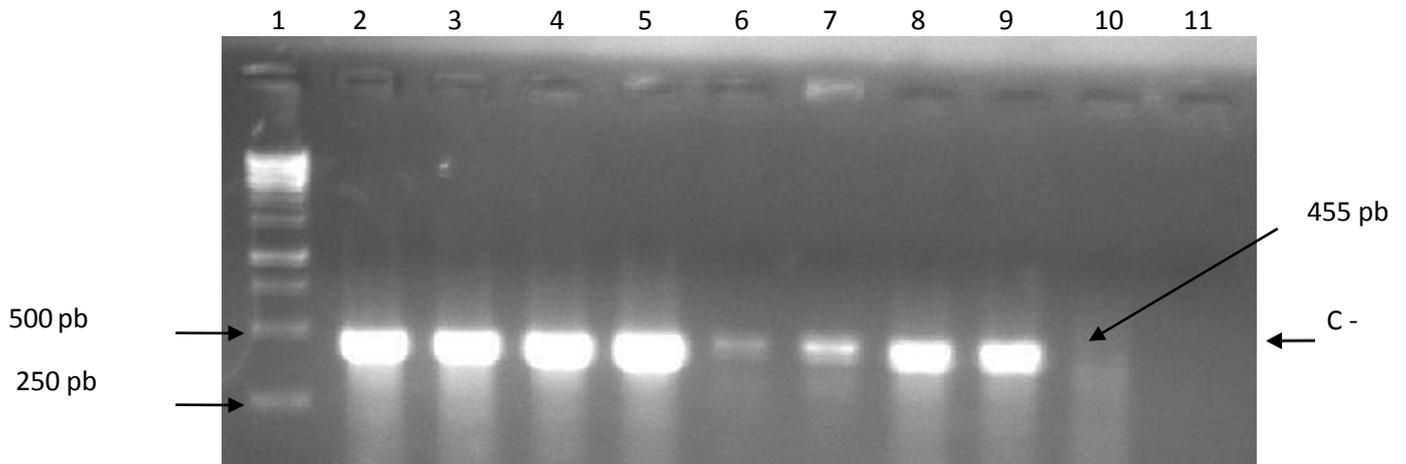


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 1 % do produto de PCR convencional para detecção do genoma viral – PCR com primers MY 09/11 com amplicon de 455 pb. No poço 1 foi aplicado o DNA step ladder de 1kb (Promega); do poço 2 ao 10 foram aplicadas as amostras questionadas, as quais foram todas consideradas positivas; as amostras nos poços 2,3,4,5,6,7,8 e 9; no poço 10 a amostra foi considerada negativa. No poço 11 foi aplicado o controle negativo da reação. Para visualização das bandas foi utilizado o intercalante de bases nitrogenadas, brometo de etídio e o gel foi fotografado pelo foto documentador (Loccus Biotecnologia) com luz UV.

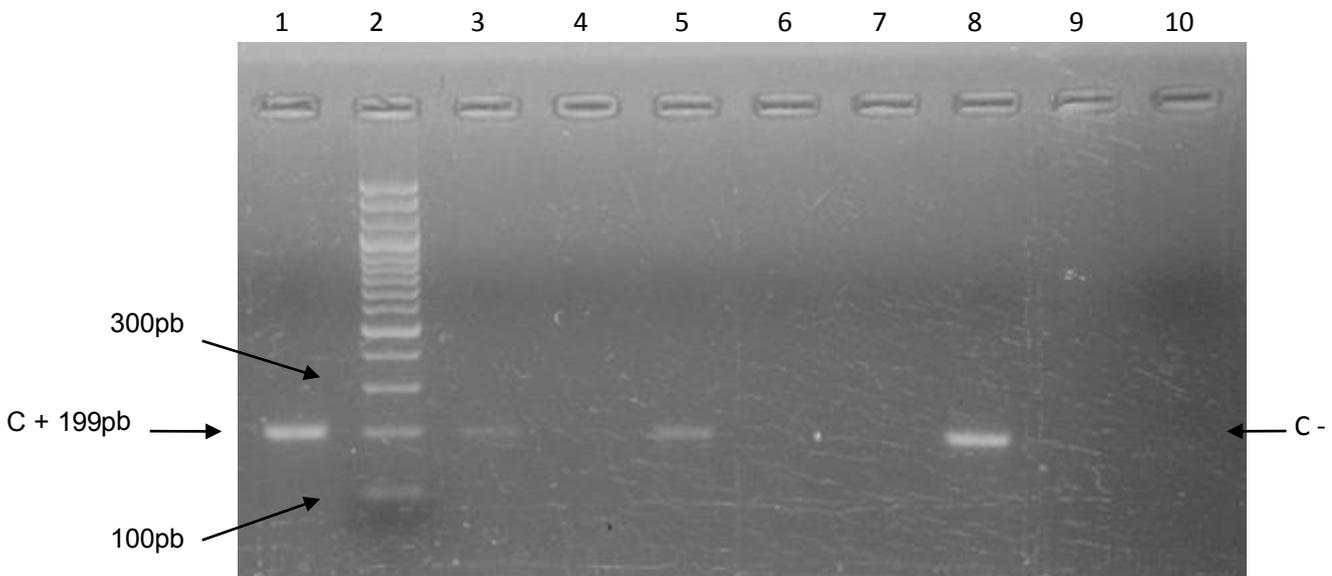


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 2,5% do produto da PCR da genotipagem do HPV 16 – Resultado da PCR com primers para genotipagem do HPV 16. No poço 1 foi aplicada uma amostra conhecida positivamente para o HPV 16; no poço 2 foi aplicado o DNA step ladder (Promega) de 100 pb; Do poço 3 ao 9 foram aplicados os produtos de PCR para genotipagem do HPV 16. Os poços 3, 5 e 8 mostraram positividade para a presença do HPV 16. Os poços 4,6,7 e 9 continham amostras que foram consideradas negativas para o HPV 16. No poço 10 foi aplicado o controle negativo da reação. O gel foi preparado com solução de TAE 1x, o qual também foi utilizado como tampão de corrida (voltagem:100v; por 20min). Para visualização das bandas foi utilizado o intercalante de bases nitrogenadas brometo de etídio, e o gel foi fotografado pelo fotodocumentador (Loccus Biotecnologia) com luz UV.

Tabela 5. Resultado das genotipagens.

HPV	33	18	58	31	16
Amostras (quantidade)	3	4	17	21	37

HPV	16/18	18/31	33/58	31/58	16/58	16/31	16/31/58
Amostras (quantidade)	2	1	2	3	7	5	1

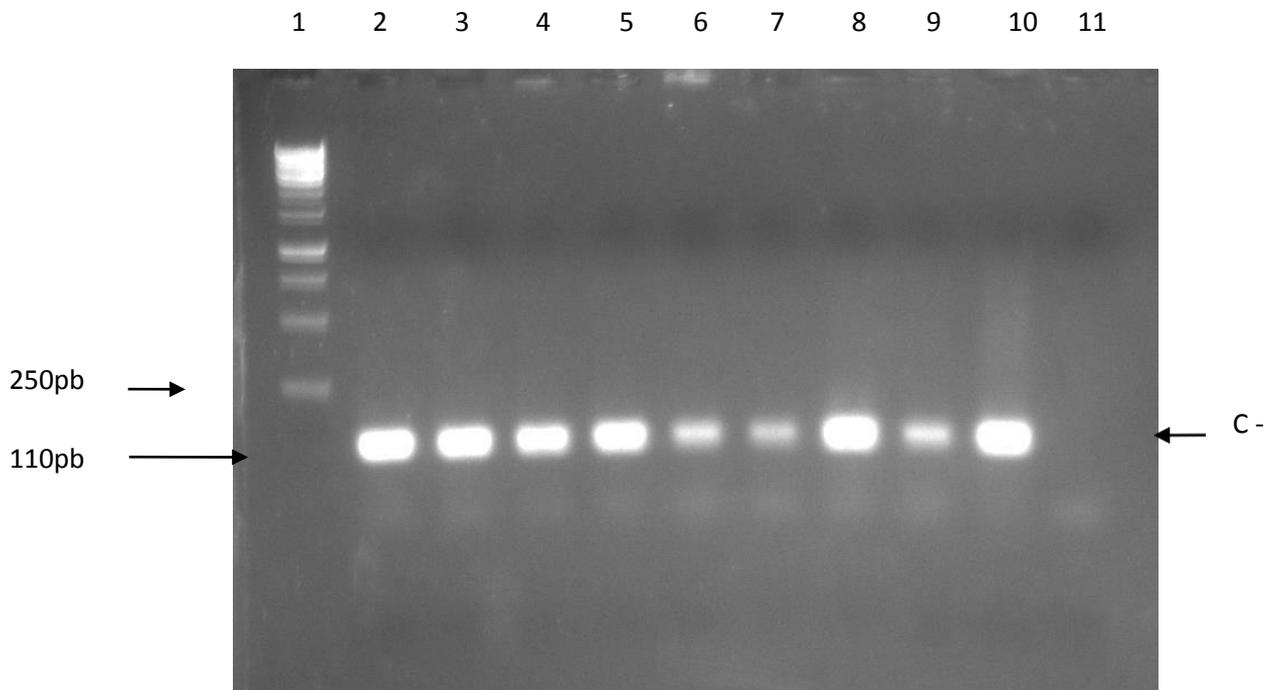


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 2% do produto de PCR do gene da β - globina humana
 - Resultado da PCR com os primers PC04/ GH20 com amplicon de 110pb. No poço 1 foi aplicado o DNA step ladder de 1kb (Promega); do poço 2 ao 10 foram aplicadas as amostras questionadas, as quais foram todas consideradas positivas; no poço 11 foi aplicado o controle negativo da reação. O gel foi preparado com solução de TAE 1x, o qual também foi utilizado como tampão de corrida (Voltagem: 100v; por 25 min). Para visualização das bandas foi utilizado o intercalante de bases nitrogenadas brometo de etídio, e o gel foi fotografado pelo fotodocumentador (Loccus Biotecnologia) com luz UV.

A qualidade do RNA extraído foi assegurada por eletroforese em gel de agarose (figura 6) e apenas amostras com RNA total apresentando concentração a

partir de 100ng e pureza, avaliada por razão da absorbância de 260/280 nm, entre 1.8 - 2.0 foram utilizadas.

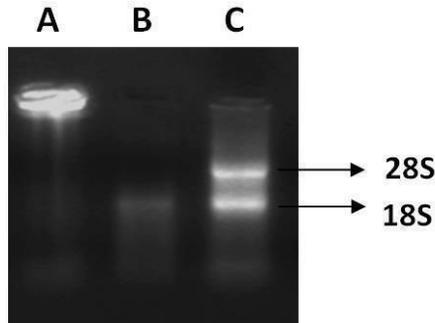


Figura 6. Padrão de bandas para controle de qualidade do RNA – A eletroforese em gel de agarose 1% foi realizada para assegurar a integridade do RNA extraído (voltagem: 100 v; por 25 min). Na coluna A mostra um RNA completamente degradado, a coluna B mostra um RNA parcialmente degradado e na coluna C está presente bandas de RNA ribossomal intactas. Este estudo incluiu apenas amostras que apresentaram um padrão de bandas da coluna C.

5.2. Avaliação da eficiência dos primers para qPCR

Os primers para os miRNAs de referência 191 e 23a, assim como para o miRNA-203 obtiveram eficiência ótima, avaliadas através de curva padrão que foi realizada em triplicata por qPCR (tabela 6) (Figuras 7 e 8). Também foi realizada a curva padrão dos primers para os RNAm de referência GAPDH e ACTB que resultaram em eficiências ótimas (Figura 8). A curva padrão de eficiência dos primers para E5 também foram obtidas e mostraram eficiência ideal (Figura 9) (Tabela 6) assim como para todos os microRNAs e RNAm mostraram especificidade do amplicon gerado (Figura 10).

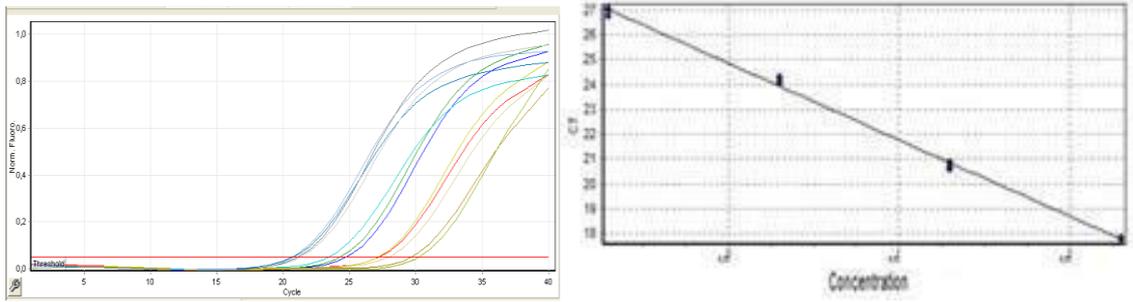


Figura 7. Curva de eficiência dos primers para o microRNA-203 - Foram feitos sete pontos de diluição (200ng, 20ng, 2ng, 200pg, 20pg, 2pg e 0.2pg) de uma amostra conhecida positiva para avaliar a eficiência dos primers na amplificação do microRNA-203 em qPCR.

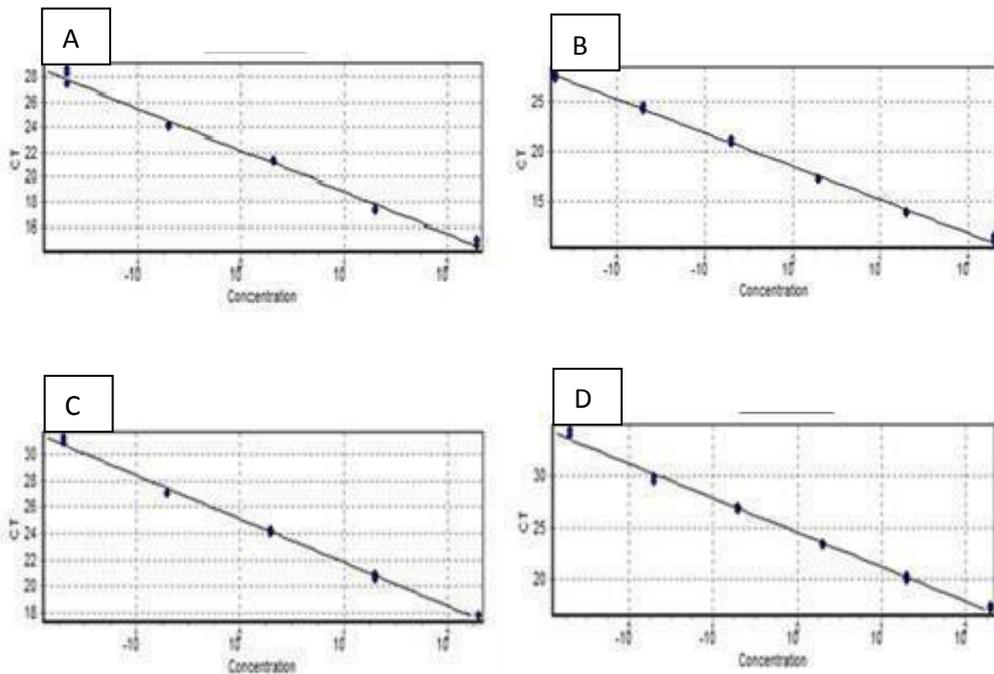
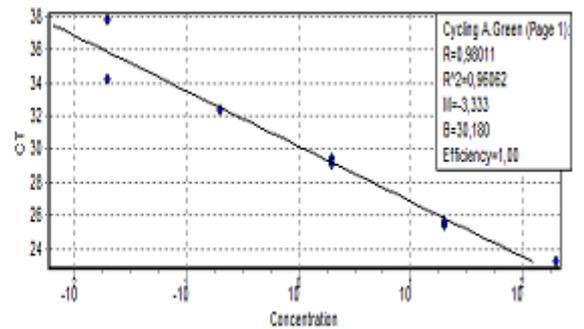
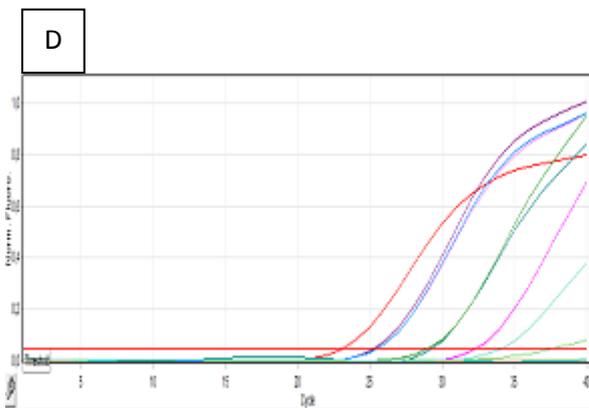
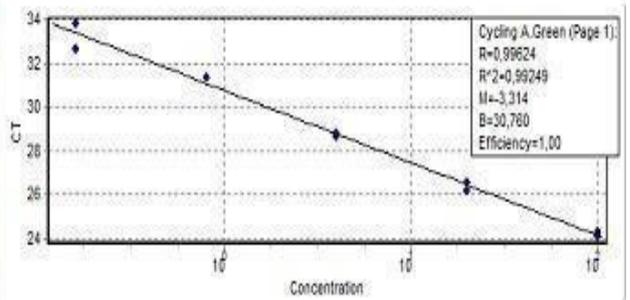
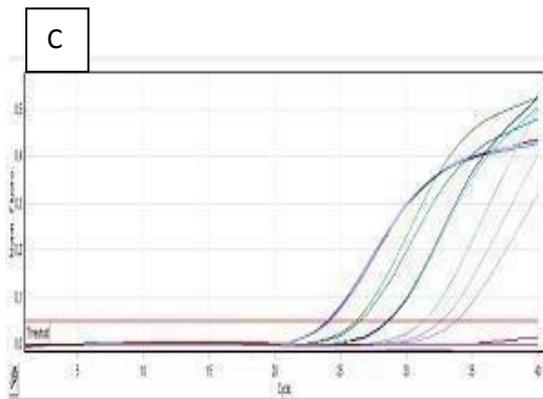
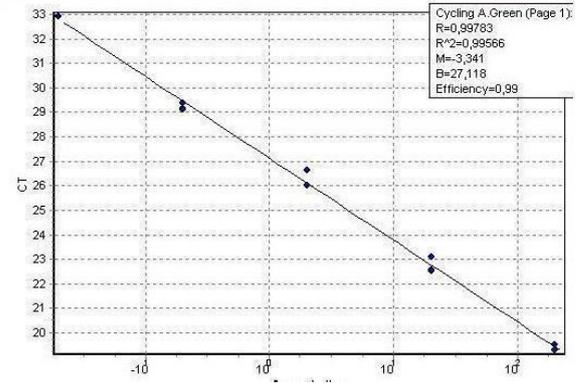
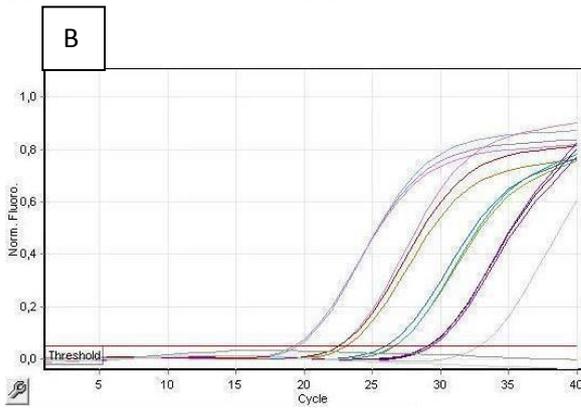
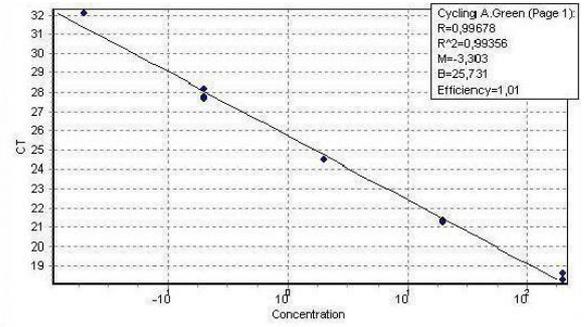
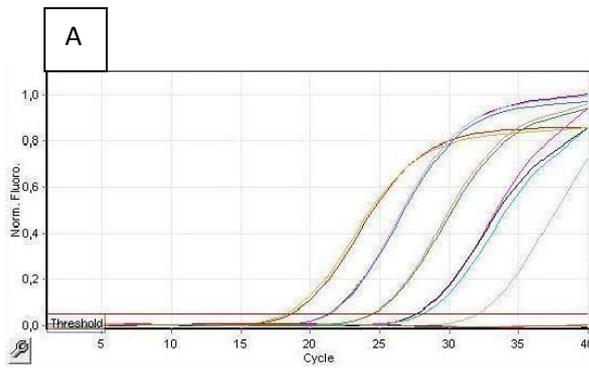


Figura 8. Curva de eficiência dos primers para os genes de referência - Foram feitos sete pontos de diluição (200ng, 20ng, 2ng, 200pg, 20pg, 2pg e 0.2pg) de amostras conhecidas positivas para avaliar a eficiência dos primers na amplificação dos RNAm e miR utilizados para normalização dos valores de expressão de E5 e do microRNA-203. Micro-RNA-191 (A), microRNA-23a (B), gene GAPDH (C) e gene ACTB (D).



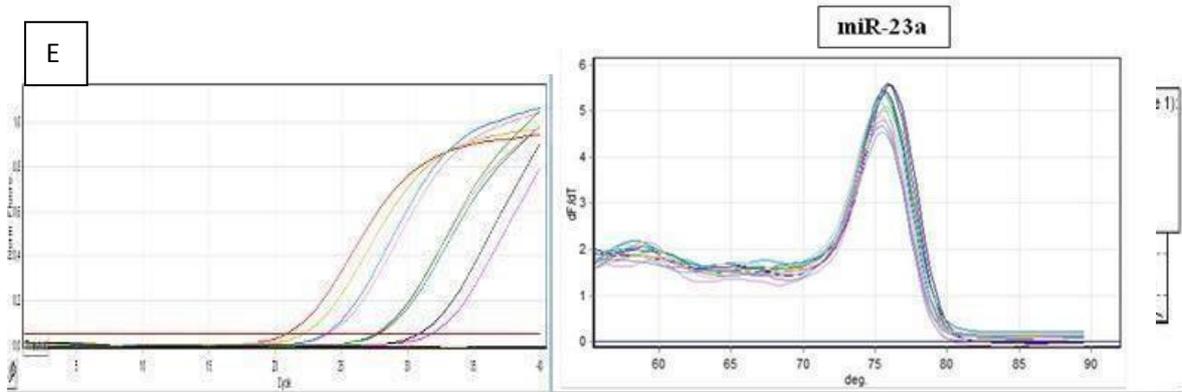
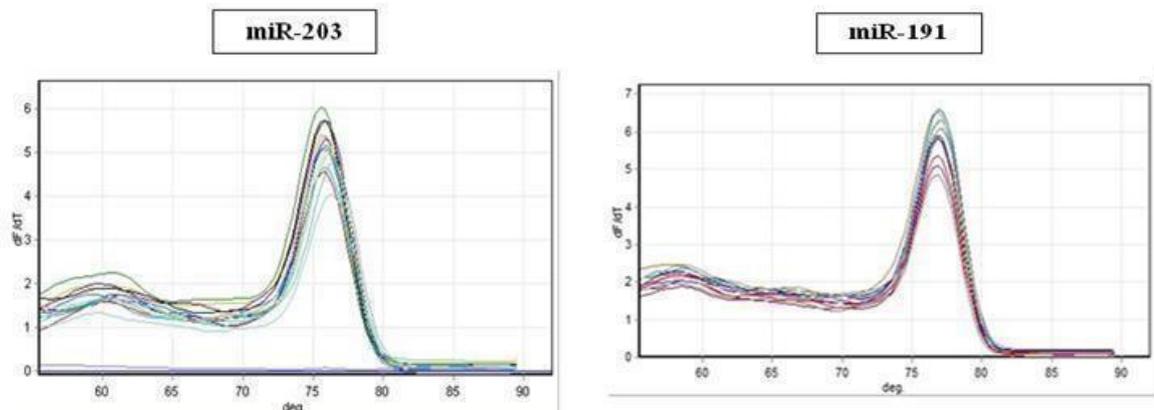


Figura 9. Curvas de eficiência dos primers para E5 do HPV 16, 18, 31, 33 e 58 – Foram feitos sete pontos de diluição (200ng, 20ng, 2ng, 200pg, 20pg, 2pg e 0.2pg) de uma amostra conhecida positiva para o HPV 16 (A), HPV 18 (B), HPV 31 (C), HPV 33 (D) e HPV 58 (E) para avaliar a eficiência dos primers utilizados em qPCR.

Tabela 6. Resultados dos parâmetros da curva padrão em qPCR dos pares de primers.

	Slope	Eficiência	R2
miR-191	-3.299	1.00	0.99121
miR-23a	-3.300	1.00	0.99501
miR-203	-3.242	1.02	0.99873
ACTB	-3.300	1.00	0.99521
GAPDH	-3.275	1.01	0.99643
E5 HPV 16	-3.303	1.01	0.99356
E5 HPV 18	-3.341	0.99	0.99566
E5 HPV 31	-3.314	1.00	0.99249
E5 HPV 33	-3.333	1.00	0.96062
E5 HPV 58	-3.324	1.00	0.98008

Parâmetros: Slope ~ -3,32; Eficiência ~ 1; R² ~ 1 (porém o valor máximo normalmente é de 0,999)



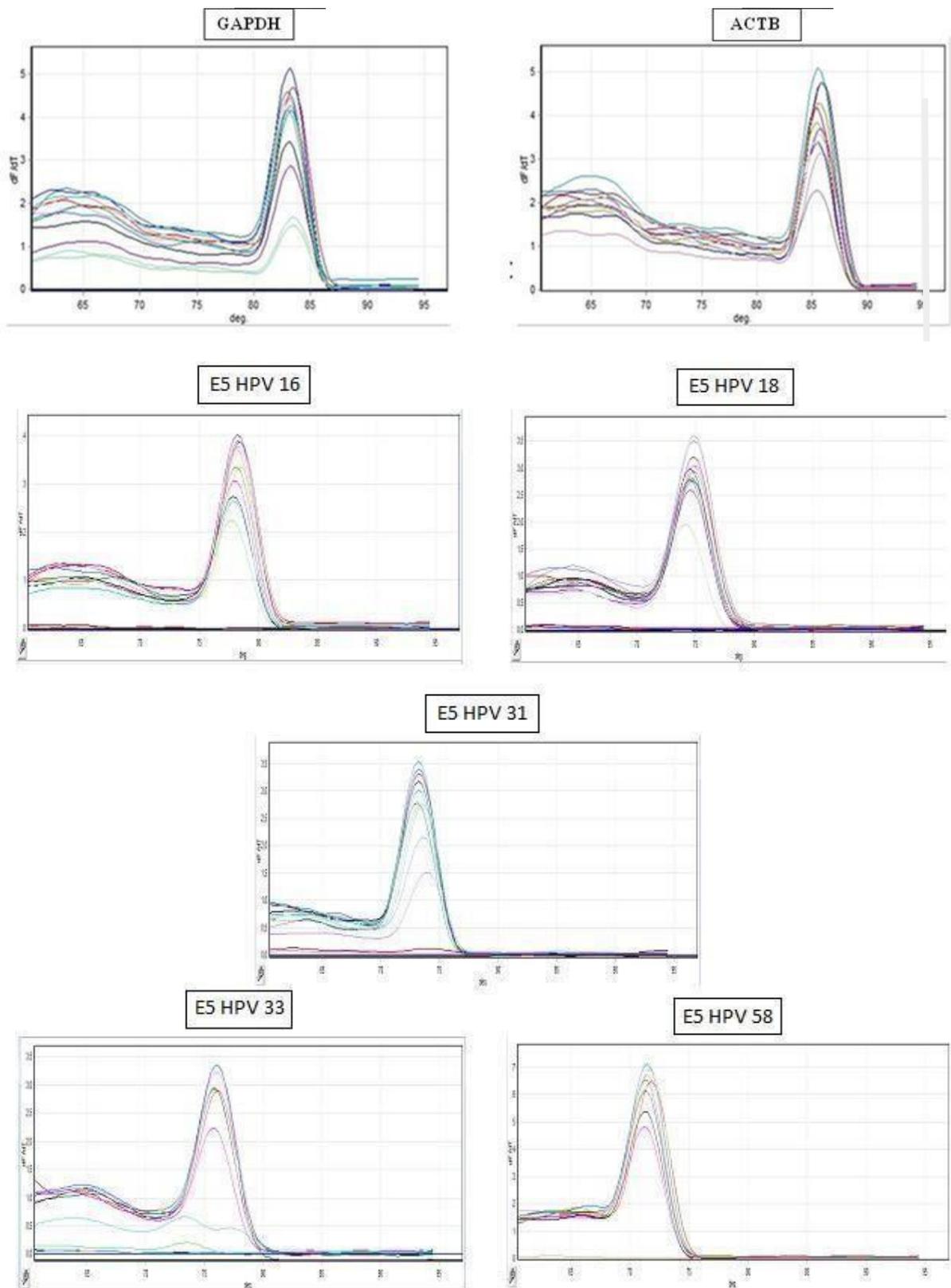


Figura 10. Curvas de melting do microRNA-203, E5 e genes de referência - Para assegurar a especificidade da reação para cada par de primer foram obtidas as curvas de melting que mostraram apenas um pico e confirmaram a especificidade na formação do amplicon.

5.3. Perfil de Expressão do miR-203

O perfil de expressão do microRNA-203 avaliado em qPCR apresentou uma diminuição das amostras normais para o câncer. A avaliação quanto a diferença de expressão do miR-203, entre os grupos de amostra, foi feita analisando todos os grupos ao mesmo tempo pelo teste de Kruskal-Wallis e dois a dois utilizando o teste de comparação múltipla de Dunn como pós-teste. O primeiro teste mostrou que existe diferença significativa de expressão do miR-203 entre os grupos ($p = 0,0353$) e o segundo revelou que entre os estágios normal x câncer existe uma diminuição de expressão estatisticamente significante ($p < 0,05$). O gráfico (figura 11) demonstrando a expressão do miR-203 permite visualizar a diminuição da mediana de expressão deste microRNA do grupo normal para o NIC I, com um aumento do NIC I para o NIC II e uma diminuição gradativa do NIC II para o NIC III e câncer, entretanto nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os outros grupos mencionados.

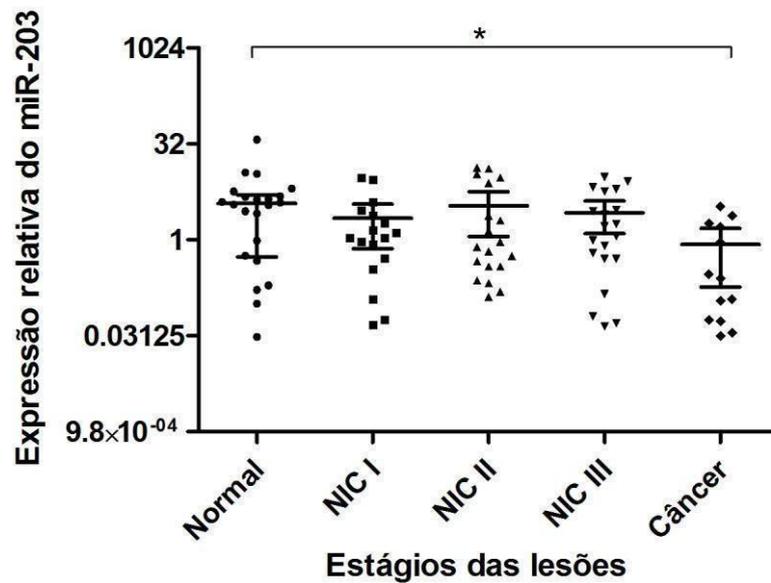


Figura 11. Expressão do MicroRNA-203 nos diferentes estágios- Gráfico expõe a avaliação das diferenças de expressão do miR-203 entre as diferentes condições do tecido cervical, feito através dos testes Kruskal-Wallis e Dunn. Os dados não apresentaram distribuição normal e as medianas mostram as diferenças na expressão dos grupos. Os asteriscos mostram a significância da diferença de expressão entre cada grupo: * $p < 0,05$.

5.4. Perfil de expressão do oncogene E5

Das 90 amostras avaliadas, em 50 destas (20 normais; 6 NIC I; 11 NIC II; 4 NIC III; 5 Câncer) não foi possível detectar a expressão de E5 de nenhum dos HPV's genotipados (16, 31, 58, 18 e 33). A quantidade de amostras positivas para E5 de cada HPV seguiu a ordem de prevalência dos HPV's detectados nas biópsias, com HPV 16 sendo o mais prevalente e com mais amostras positivas para E5, seguido pelo HPV 31, HPV 58, HPV 33 e HPV 18 (com estes dois últimos apresentando igual prevalência e igual número de amostras positivas para a expressão de E5).

Devido a pequena quantidade de amostras positivas para o HPV-33 (3) e HPV-18 (4) nenhuma avaliação estatística pôde ser realizada, pois em apenas duas

amostras positivas para o HPV 33 (1 NIC I e 1 NIC III) e duas para o HPV 18 (1 NIC II e 1 de câncer) foi possível detectar a expressão de E5 (Figura 12).

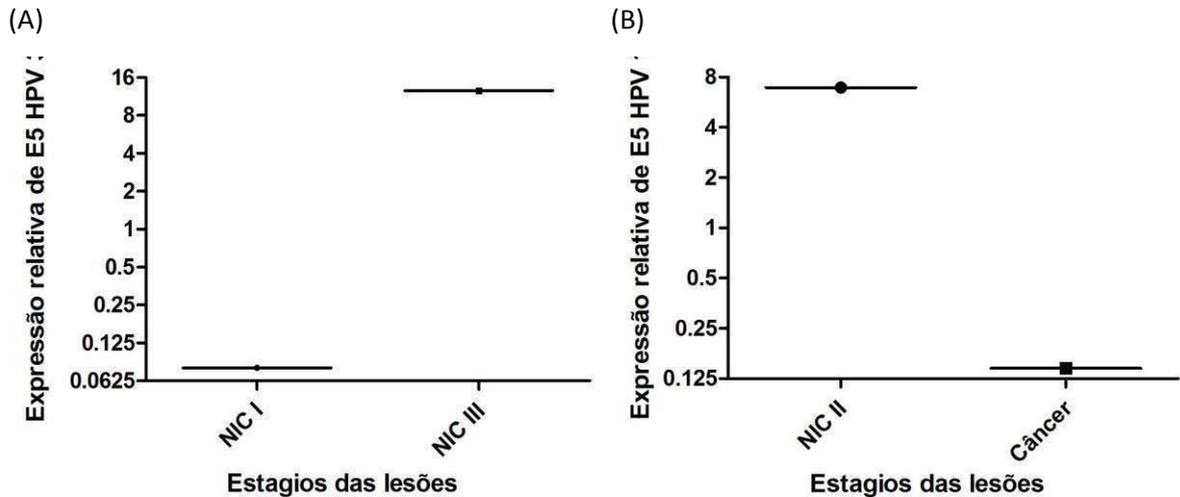


Figura 12. Expressão relativa de E5 do HPV 18 e 33 ao longo da carcinogênese cervical- Gráfico (A) mostra a expressão relativa das duas amostras positivas para E5 do HPV 33; O gráfico (B) mostra a expressão relativa das duas amostras positivas para E5 do HPV 18. Em ambos os casos não foi possível executar a avaliação estatística devido ao número de amostras.

E5 do HPV 58 foi detectado em 6 amostras das 17 amostras positivas para este HPV (1 NIC II e 5 NIC III) (Figura 13), porém também não foi possível avaliação estatística por causa do número de amostras positivas para E5 em cada grupo de lesão. Ainda assim, foi possível visualizar um aumento de expressão nas amostras NIC III comparadas a NIC II.

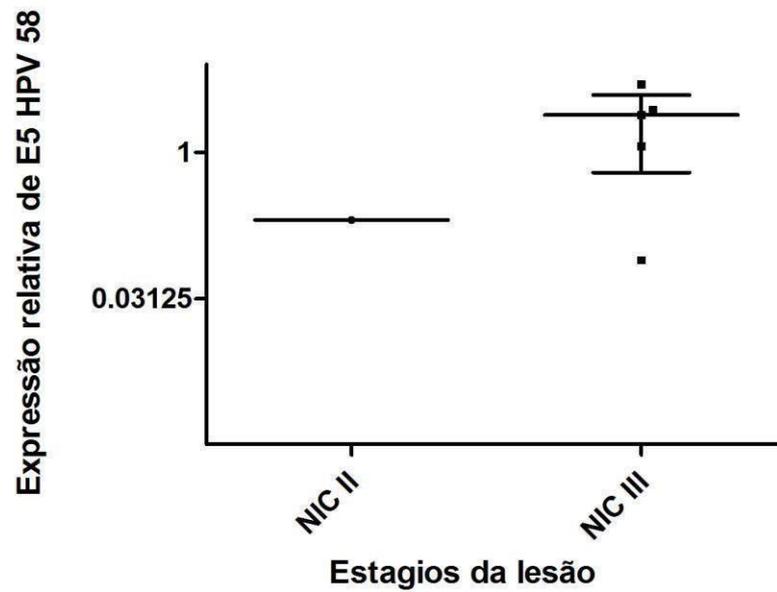


Figura 13. Expressão relativa de E5 do HPV 58 ao longo da carcinogênese cervical- Gráfico expondo a expressão relativa de E5 do HPV 58 entre NIC II e NIC III. Não foi possível a realização dos testes estatísticos devido ao número de amostras positivas.

O HPV 31 foi detectado em 21 amostras das quais 11 amostras mostraram expressão de E5 (1 NIC I, 3 NIC II, 3 NIC III e 4 cânceres). Os perfis de expressão mostraram um aumento no grupo NIC II comparado ao NIC I, seguido por diminuição na mediana das amostras no grupo NIC III e comparada a esse houve um aumento no grupo câncer. O teste estatístico de Kruskal-Wallis foi aplicado, porém nenhuma diferença significativa na expressão de E5 ao longo das lesões foi encontrada ($p = 0,4512$) (Figura 14). A comparação dois-a-dois, pelo pós-teste de Dunn, também não revelou significância estatística.

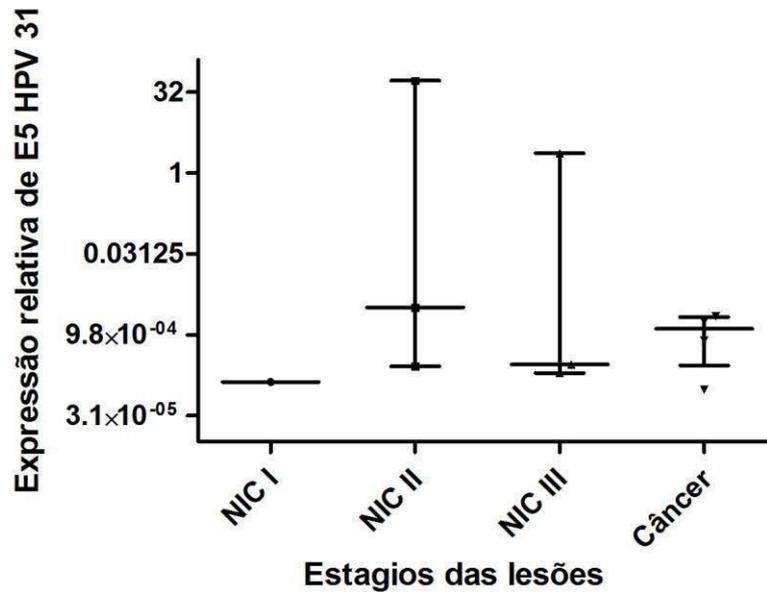


Figura 14. Expressão relativa de E5 do HPV 31 ao longo da carcinogênese cervical- Gráfico expondo a expressão relativa de E5 do HPV 31 entre as diferentes condições do tecido cervical, onde não foi encontrada diferença estatística entre os grupos amostrais na avaliação pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn.

O HPV 16 foi detectado em 37 amostras e o RNAm de E5 foi detectado em 30 destas amostras (Figura 15). Foi encontrada diferença na expressão de E5 do HPV 16 entre os grupos NIC I x NIC III ($p < 0,01$) e NIC I x Câncer ($p < 0,05$) porém nenhuma significância foi encontrada entre os grupos NIC I x NIC II (mostrando um perfil similar), NIC II x NIC III, NIC II x Câncer e NIC III x Câncer.

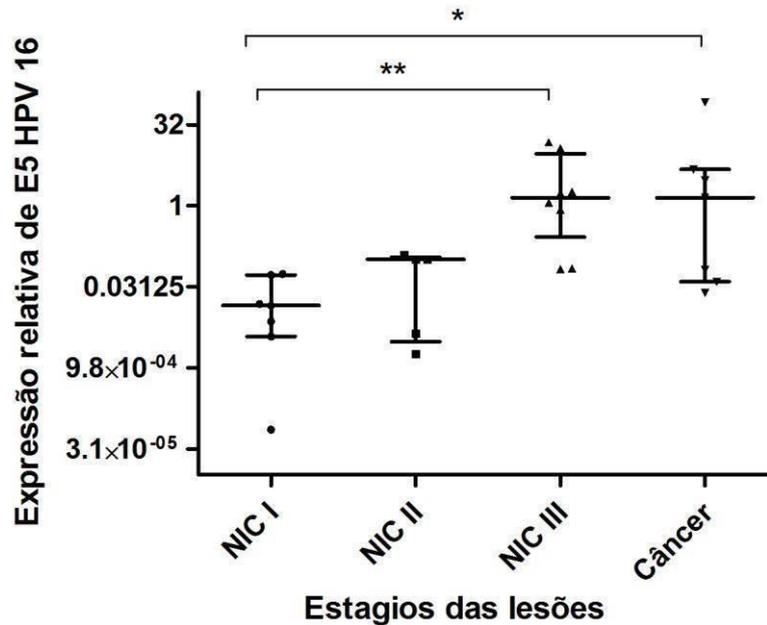


Figura 15. Expressão relativa de E5 do HPV 16 ao longo da carcinogênese cervical- Gráfico expondo a expressão relativa de E5 do HPV 16 entre as diferentes condições do tecido cervical. O teste de Kruskal-Wallis mostrou uma diferença significativa na expressão de E5 entre os grupos ($p = 0,0041$). O pós-teste de Dunn mostrou as respectivas diferenças estatísticas entre os grupos marcados: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.5. Correlação entre os perfis de expressão do miR-203 e do oncogene E5

O teste de Spearman foi aplicado para avaliar uma possível correlação entre os perfis de expressão apresentados por ambos os alvos.

Para os HPVs 18, 33 e 58 devido ao baixo número de amostras positivas para E5, nenhum estudo de associação pôde ser realizado.

A prevalência do HPV 31 permitiu a análise de correlação de E5 com o miR-203 nos estágios NIC II, NIC III e câncer, mostrando uma tendência a correlação positiva em amostras de câncer, porém nenhuma correlação estatisticamente significativa foi encontrada (Tabela 7).

Tabela 7. Valores do coeficiente de correlação entre os perfis de expressão de E5 do HPV 31 e do miR-203 nos grupos amostrais pelo teste de Spearman. Não foi encontrado valor de $p < 0,05$.

	E5 RNAm NIC II	E5 RNAm NIC III	E5 RNAm Câncer
miR-203 NIC II	0,500		
miR-203 NIC III		0,500	
miR-203 Câncer			0,800

O HPV 16 não apresentou correlação estatisticamente significativa entre E5 e o miR-203 nas amostras (NIC I, NIC II, NIC III e câncer), entretanto o coeficiente de correlação foi negativo em amostras NIC I e fracamente negativo em amostras NIC III, forte positivo nos grupos NIC II e fraco positivo no câncer (tabela 8).

Tabela 8. Valores do coeficiente de correlação entre os perfis de expressão de E5 do HPV 16 e do miR-203 nos grupos amostrais pelo teste de Spearman. Não foi encontrado valor de $p < 0,05$.

	E5 RNAm NIC I	E5 RNAm NIC II	E5 RNAm NIC III	E5 RNAm Câncer
miR-203 NIC I	-0,4285714			
miR-203 NIC II		0,700		
miR-203 NIC III			-0,0958101	
MiR-203 Câncer				0,08571429

6. Discussão

6.1. Expressão do miR-203

O miR-203 é responsável pela regulação de vários genes envolvidos no ciclo celular, proliferação, diferenciação e apoptose (Esquela-Kerscher A., Slack F. J., 2006). Por ser um microRNA específico de células epiteliais (Sonkoly E. et al., 2007)

tem um papel importante no desenvolvimento do epitélio estratificado e se encontra em níveis aumentados quanto maior foi o grau de diferenciação dos queratinócitos (McKenna, J.D. *et al.* 2010). Estudos reportaram que a expressão do miR-203 inibe a proliferação celular, tanto *in vitro* (Lena, A.M.R. et al., 2008; McKenna, J.D. et al., 2010; Wilting, S.M. et al., 2013) como *in vivo* (Yi et al., 2008) e é reconhecido como essencial no controle dos níveis de diferenciação dos queratinócitos pela regulação da expressão de genes (Truong and Khavari, 2007; Melar-New and Laimins, 2010; McKenna, J.D. *et al.* 2010).

O perfil alterado do miR-203 nos diversos processos carcinogênicos (Tabela 9) e sua estreita relação com queratinócitos mostra a importância de avaliar seu papel no câncer cervical assim como sua possível utilização no diagnóstico, prognóstico e terapias.

Alguns estudos avaliaram o perfil de expressão do miR-203 em linhagens celulares, tanto de carcinoma quanto de lesões pré-cancerosas, e encontraram níveis de expressão diminuídos em relação ao tecido normal (Greco, D. et al., 2012; Jiménez-Wences, H. et al., 2014; Melar-New and Laimins, 2010). Nossos resultados concordam com os achados *in vitro*, mostrando uma diminuição dos níveis de expressão do miR-203 no câncer quando comparado com tecido normal ($p < 0,05$). Além de pesquisas *in vitro*, estudos com amostras clínicas foram realizados e mostraram divergências quanto ao perfil de expressão deste microRNA (Jiménez-Wences, H. et al., 2014). Vários trabalhos encontraram o miR-203 com menor expressão no câncer, em relação a tecidos normais (Lee, J.W. et al., 2008; Pereira, P.M. et al., 2010;), enquanto Gocze, K. et al. (2013), Witten, D. et al. (2010) e Muralidhar, B. et al (2007) apontaram que o miR-203 encontra-se super expresso no câncer cervical (Tabela 10).

Tabela 9. Perfil de expressão do miR-203 nos diferentes tipos de câncer.

Expressão do miR-203	Aumentado	Diminuído	Referências
Câncer cervical		X	Lee, J.W. et al. (2008)
Câncer endometrial	X		Chung, T.K. et al. (2009)
Carcinoma escamoso de cabeça e pescoço		X	Yuan Y. et al. (2011)
Câncer esofageal		X	Zhang F. et al. (2014)
Câncer de próstata		X	Viticchie` G. et al. (2011)
Carcinoma de laringe		X	Bian K. et al. (2012)
Linfoma gástrico de células B		X	Craig V.J. et al.(2011)
Processos malignos hematopoiéticos		X	Bueno M.J. et al. (2008)
Câncer de colón		X	Li J. et al. (2011)
Melanoma		X	Noguchi S. et al. (2012)
Adenocarcinoma pancreático	X		Ikenaga N. et al. (2010).

Tabela 10. Perfil de expressão do miR-203 no câncer cervical.

Referencia	Perfil de expressão miR-203	Tipo de amostra	Condições das amostras
Wilting, S.M. et al. (2013)	Diminuído	Linhagem celular e amostras clínicas	Câncer; Normal, HSIL e câncer
Lee, J.W. et al. (2008)	Diminuído	Amostras clínicas	Câncer e Normal
Wang, X. et al. (2008)	Diminuído	Linhagem celular; Cultura de queratinócitos; Amostras clínicas.	Câncer e normal; Queratinócitos primários; Normal e câncer
Muralidhar, B. et al. (2007)	Aumentado	Linhagem celular; Amostras clínicas	Câncer e normal; câncer e normal
Cheung, T.H. et al. (2012)	Diminuído	Amostras clínicas	Câncer, HSIL e Normal
Pereira, P.M. et al. (2010)	Diminuído	Amostras clínicas	Câncer, LSIL, HSIL e Normal
Zhao, S. et al. (2013)	Diminuído	Amostras clínicas	Câncer e Normal
Zhu, X. et al. (2013)	Diminuído	Linhagem celular; Amostras clínicas	Câncer e normal; Câncer e Normal
Gocze, K. et al. (2013)	Aumentado	Amostras clínicas	Câncer e Normal
Ma, D. et al (2012)	Diminuído	Amostras clínicas	Câncer e lesões ginecológicas benignas
Melar-New e Laminins (2010)	Diminuído	Cultura de queratinócitos	Normal e infectado com HPV 31
Martinez, I. et al. (2008)	Diminuído	Linhagem celular; amostras clínicas.	Câncer, HPV 16 e 18 positivas; amostras clínicas de neoplasia cervical pré-invasiva

A divergência de resultados entre o nosso estudo e outros trabalhos quanto ao perfil de expressão do miR-203 pode ser, entre outros fatores, devido a normalização dos dados que é feito através dos genes de referência. Leitão,

Md.C.G. et al. (2014) mostrou que o perfil de expressão pode mudar de acordo com quais e quantos genes de referência são utilizados, e que pelo menos dois, apontados como mais estáveis, devem ser obtidos para uma normalização adequada. Os trabalhos anteriores utilizaram apenas um gene de referência para a normalização do dados.

Além da normalização, fatores como variabilidade entre populações, diferentes plataformas e métodos de processamento das amostras, bem como análise dos dados, podem estar relacionados com os diferentes achados a respeito da expressão do miR-203 (Rao Q. et al., 2012; Pereira, P.M. et al., 2010).

Apesar da diminuição da expressão do miR-203, foi visto um aumento dos níveis de expressão relativa em NIC 2 em relação a NIC I, porém não houve diferença significativa. Este mesmo perfil foi observado por Leitão, Md.C.G. et al. (2014) que também avaliou o miR-203 em amostras clínicas nas diversas condições (Normal, NIC 1, NIC 2, NIC 3 e câncer). Os trabalhos publicados até o momento, que utilizaram amostras clínicas, não avaliaram as lesões NIC II ou quando avaliaram não o fizeram separadamente, sempre unindo NIC II e NIC III como lesão de alto grau, impossibilitando a avaliação da expressão do miR-203 em cada etapa da carcinogênese.

Pela dificuldade existente de diferenciar com precisão lesões NIC II de NIC III, através dos métodos de rastreio e diagnóstico atuais, a análise destas lesões separadamente torna-se complexa e por isto é importante avaliar a expressão de genes que sejam eficazes nesse aspecto. O aumento de expressão em amostras NIC II e a diminuição de expressão gradativa nas amostras de NIC III e câncer sugere a possibilidade de usar o miR-203 para separação de cada tipo de lesão e fornecer informações sobre a severidade e progressão da doença. Outros trabalhos

também encontraram o perfil do miR-203 diminuído em lesões de alto grau (Cheung, T.H. et al., 2012; Pereira, P.M. et al., 2010) assim como no câncer, fornecendo suporte a essa teoria.

A respeito dos níveis de expressão diminuídos do miR-203 no câncer, várias hipóteses são levantadas como justificativa. Wilting, S.M. et al. (2013) mostrou em amostras clínicas e em linhagens celulares (SiHa e Hela) que, tanto em lesões NIC III como no câncer, houve um aumento nos níveis de metilação e associaram indiretamente com a diminuição de expressão do miR-203. Botezatu, A. et al. (2011) também encontrou padrões de metilação no miR-203, porém não avaliou a expressão desse microRNA. O miR-203 está localizado em ilhas CpG que favorecem a hipermetilação do DNA e silenciamento gênico, tornando comum a alteração do miR-203 no câncer cervical (Sato, F. et al., 2011; Zheng, Z.M. et al., 2011; Saavedra, K.P. et al., 2012), e em grande parte essa alteração é devido a presença do HPV (Wang, X. et al., 2008; Li, J. et al., 2010; Botezatu, A. et al., 2011; Yao, T. et al., 2013).

Em trabalhos anteriores foi demonstrado que oncogenes do HPV 16 são capazes de regular enzimas de mecanismos epigenéticos importantes (Jimenez-Wences, H. et al., (2014), como por exemplo DNA metiltransferases que modificam a expressão do gene da proteína p53 e microRNAs (Au Yeung, C.L. et al., 2010; Wilting, S.M. et al., 2010; Leonard, S.M. et al., 2012; Chaiwongkot, A. et al., 2013). Essas variações causam a transformação celular e levam a formação do câncer.

Em concordância, Greco, D. et al. (2012) encontrou que em células HaCat expressando a oncoproteína E5 do HPV 16 os níveis de miR-203 são mais baixos quando comparado a células que não estavam expressando essa oncoproteína (Tabela 11). Já Melar-New and Laimins (2010) apresentaram em seu trabalho que a

ação da oncoproteína E7 impede a ativação da transcrição do miR-203 através da via do MAPK/PKC, inibindo fatores de transcrição, além de sugerirem que esse microRNA está relacionado com a amplificação do genoma do HPV e, por isso, estaria com sua expressão diminuída no câncer.

Ainda apoiando o envolvimento de oncogenes do HPV na alteração da expressão do miR-203, McKenna, J.D. et al. (2010) revelou que em cultura de queratinócitos a diminuição do miR-203 no câncer foi devido a degradação de p53, realizada pela oncoproteína E6 do HPV 16, causando danos no DNA e desequilíbrio da proliferação e diferenciação. Estudos prévios mostraram que p53 regulou a expressão do miR-203 em mama e colón (Brosh, R et al., 2008; Suzuki, H. I. et al., 2009) tornando plausível que o mesmo possa ocorrer no tecido cervical.

Na maioria das hipóteses sugeridas, o HPV é o principal fator modificador da expressão do miR-203. Para que a célula infectada permaneça em proliferação e não entre em estado de diferenciação e apoptose, é necessária a inibição do miR-203, já que este miR impede a amplificação e a manutenção a longo prazo do genoma do HPV. Com inibição do miR-203 ocorre um aumento dos níveis dos seus alvos, incluindo o Δ Np63, que é responsável pela proliferação dos queratinócitos (Melar-New and Laimins, 2010), e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), envolvido na angiogênese e crescimento tumoral (Zhu, X et al., 2013). Com isso a inibição do miR-203 fornece um ambiente ideal para progressão da doença.

Tabela 11. Hipóteses sobre a diminuição do perfil de expressão do miR-203 no câncer cervical.

Possíveis causas da diminuição dos níveis de miR-203 de acordo com a progressão das lesões	Referências
Regulação por E7	Melar-New and Laimins. (2010)
Regulação por E5	Greco, D. et al. (2011)
Mudanças epigenéticas devido à carcinogênese e infecção por HPV de alto risco	Botezatu, A. et al. (2011); Yao, T. et al. (2013); Jiménez-Wences, H. et al. (2014)
Regulação por E6	McKenna, J.D. et a. (2010)

Apesar das várias hipóteses e sugestões, os mecanismos, vias e moléculas envolvidas na alteração do miR-203 ainda são questões que necessitam de maiores estudos, principalmente *in vivo*.

6.2. Expressão do oncogene E5

Todas as oncoproteínas do HPV apresentam papéis importantes na formação do câncer cervical, entretanto a oncoproteína E5 requer, ainda, uma maior atenção devido ao pouco que sabemos sobre seus mecanismos e vias de atuação. Estudos trouxeram evidências que E5 atua na proliferação, migração e invasão de células *in vitro*, além de acelerar o crescimento tumoral *in vivo* (Liao, S. et al., 2013), porém poucos estudos avaliaram sua expressão em lesões pré-neoplásicas (LSIL e HSIL) e nenhum, até o nosso conhecimento, estudou o perfil de E5 em cada etapa da carcinogênese, separadamente (NIC I, NIC II, NIC III e câncer).

Além disso, devido a maior prevalência mundial do HPV 16, os estudos avaliam esse HPV com maior frequência, porém raramente incluem em estudos outros HPVs de alto risco que em nossa população, principalmente, são também encontrados. Em muitos países o HPV 16 é seguido em prevalência pelo HPV 18, mas em

Pernambuco a ordem de prevalência encontrada em nosso trabalho e por Gurgel, A.P. et al. (2015) foi HPV 16 seguido pelo HPV 31, HPV 58, HPV 33 e HPV 18.

Por causa do baixo número de amostras em que foi possível obter a expressão de E5 dos HPV 18, HPV 33 e HPV 58, pouco podemos inferir sobre esses HPVs e mais estudos são necessários para maiores esclarecimentos. Apesar disso, foi possível observar que os HPVs de alto risco oncogênico, 18 e 33, só foram encontrados sem a presença dos outros HPVs (16, 31 ou 58) em 1 amostra, cada.

Na Suíça um estudo avaliou mulheres Africanas e revelaram que a presença de co-infecção dos HPVs 16 e 18 tinham uma probabilidade 4 vezes maior de desenvolver lesões de alto grau NIC 2 (Catarino R. et al., 2016). Outros estudos também já verificaram que a presença de co-infecção aumenta o risco de desenvolvimento do câncer cervical (Trottier, H. et al., 2006) assim como a associação de HPVs de alto risco aumenta a chance de infecção persistente (Nielson, C.M. et al., 2009).

E5 do HPV 33 mostrou uma amostra NIC III com expressão maior que a amostra NIC I e o HPV 18 apresentou a expressão de E5 mais baixa na amostra de câncer que na amostra de NIC II. O HPV 58, presente em 17 amostras, apesar de apresentar um número considerável de amostras positivas só apresentou 6 amostras expressando E5, das quais 5 foram amostras NIC III com maior nível de expressão que a única amostra do grupo NIC I, mas nenhuma avaliação estatística pôde ser realizada e não há relatos anteriores na literatura.

E5 do HPV 31 pôde ser avaliado em 11 amostras que eram positivas para este HPV e mostrou um perfil de expressão que possuiu similaridades com os HPV 18, 33 e 58. Amostras do grupo NIC II mostraram a mediana dos níveis de expressão de E5 elevados comparada a amostra positiva para NIC I, com diminuição da mediana

de expressão de amostras NIC II para NIC III e aumento de expressão no câncer comparado a amostras NIC III. Talvez com um aumento no número de biopsias, os HPV 18, 33, 58 e 31 os perfis de expressão do oncogene E5 possam ser melhor delimitados para melhor avaliação.

Como já citado, o HPV 16 é o mais prevalente em vários lugares no mundo (Kiani, S. J., et al., 2015; Rogovskaya, S. I. et al., 2013; Lu-lu, S. et al., 2012) e, com isso, é o HPV de alto risco oncogênico mais estudado. Já foi estabelecido na literatura que para a formação do câncer cervical ocorre a integração do genoma do HPV no genoma hospedeiro, formando a infecção persistente e acarretado em perda ou diminuição da expressão de alguns oncogenes virais como E2 e E5 (Muto, V. et al., 2011). Entretanto, mesmo com a integração viral, alguns níveis de E5 ainda podem ser obtidos de forma episossomal ou devido a genomas de HPV 16 que foram capazes de se integrar completamente no genoma hospedeiro, sem perdas (Chang, J.L. et al., 2001; Van Tine, B.A. et al., 2004; Hafner, N. et al., 2008), e estes resultados suportam nossos dados onde E5 do HPV 16, não só apresentou expressão em amostras de câncer, como também possuiu níveis maiores do que amostras NIC I.

E5 do HPV 16 mostrou um aumento de expressão de NIC I para NIC II, mas sem diferença estatisticamente significativa, seguido por um aumento de NIC II para NIC III e perfis semelhantes de NIC III para o câncer, sem diferença estatística encontrada. Quando comparados NIC III e câncer com amostras NIC I diferenças significativas foram visualizadas ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). Os diferentes níveis de expressão de E5 do HPV 16 entre as lesões NIC II e NIC III, consideradas lesões de alto grau – HSIL – e normalmente avaliadas juntas, e a maior similaridade nos níveis de expressão de E5 das amostras de NIC II com amostras NIC I, do que

com NIC III, sugerem que lesões NIC II e NIC III possuem padrões moleculares diferentes.

Dois estudos avaliaram a expressão de E5 do HPV 16 em lesões LSIL e HSIL utilizando amostras citológicas, e encontraram um perfil de expressão com grande variabilidade (alguns acima e outros abaixo do controle positivo) em amostras LSIL e um perfil diminuído em relação ao controle positivo em amostras HSIL (French, D. et al., 2013; Lorenzo, L. et al., 2011), esses resultados foram atribuídos a variação na distribuição de genomas virais integrados e episomais. Em nossos resultados o perfil de expressão de E5 no câncer apresentou uma maior variabilidade nas amostras, o que pode ser devido a essa distribuição na integração do genoma do HPV 16.

6.3. Correlação do perfil de expressão do oncogene E5 e do miR-203

Baseado no estudo de Greco, D. et al. (2011) que relatou a regulação negativa do miR-203 em células HaCat transfectadas com E5 do HPV 16, o presente trabalho objetivou a avaliação dessa possível interação em amostras clínicas. Tanto o HPV 31 quanto o HPV 16 obtiveram amostras suficientes expressando o oncogene E5 para a avaliação da correlação entre os perfis de expressão.

Foi possível verificar que no câncer o miR-203 apresenta níveis diminuídos de expressão e que nestas mesmas amostras o oncogene E5 do HPV 31 está sendo expresso. Porém, o esperado era que existisse uma relação negativa entre esses alvos onde quando E5 estivesse aumentado o miR-203 estivesse diminuído e vice-versa. Entretanto o que foi observado foi um coeficiente de correlação positivo tanto

em NIC II ($r = 0,5$) como em NIC III ($r = 0,5$) e câncer, e nesta última lesão apresentou um forte coeficiente positivo ($r = 0,8$) mesmo sem nenhuma significância estatística. A correlação não pôde ser avaliada em lesões NIC I dado o número de amostras positivas para E5 do HPV 31.

Assim como para E5 do HPV 31, E5 do HPV 16 também foi avaliado quanto a possível correlação com os níveis do miR-203 e novamente, assim como no padrão de expressão de E5, este HPV se comportou de forma diferente dos demais, o que pode justificar a sua alta prevalência e risco de oncogenicidade. Nenhuma correlação foi encontrada, porém em amostras NIC I observa-se um coeficiente negativo ($r = -0,4285714$) indicando que enquanto o miR-203 está aumentado o RNAm de E5 do HPV 16 está diminuído. Já em NIC II existe um coeficiente fortemente positivo ($r = 0,700$) mostrando que ambos aumentam suas expressões em conjunto. Já em NIC III e câncer os coeficientes tendem a zero ($r = -0,0958101$ e $r = 0,08571429$, respectivamente), mas ainda em NIC III os níveis de E5 estão aumentando e o miR-203 diminuindo e, no câncer, mesmo com coeficiente fracamente positivo sua tendência seria para uma correlação negativa dado ao perfil de expressão apresentado por ambos.

Em nenhuma das análises foi encontrado significância estatística. Esse fato pode ser explicado pela quantidade vasta de moléculas que interagem no microambiente celular e que podem ser alteradas por E5. Existem possíveis vias pelas quais E5 pode atuar e indiretamente alterar a expressão do miR-203, como a ativação de metilação e inibição da expressão do miR-203 (Botezatu, A. et al., 2011; Jiménez-Wences, H. et al., 2014), alteração da biogênese deste microRNA a nível pos-transcricional através do sistema DROSHA/DICER (Davis-Dusenbery B.N. and

Hata A. 2010) ou também ativação da via AKT/PI3K que é um alvo direto do miR-203 (yu, H. et al., 2012; Qian, K. et al., 2013), além de possíveis outros mecanismos ainda não bem elucidados.

7. Conclusões

Nossos resultados mostram congruência com outros casos reportados na literatura, que apresentam o perfil de expressão do miR-203 reduzido no câncer em comparação com o controle normal.

Assim como o miR-203, a expressão do oncogene E5 também mostrou expressões diferenciadas entre os HPVs 18, 33, 31 e 58, e o HPV 16, mostrando uma maior prevalência de expressão neste último HPV, e níveis de expressão aumentando gradativamente, que foi ao contrário do esperado pela literatura, das amostras NIC I para NIC II, NIC III e câncer. Também foi possível visualizar que E5 do HPV 16 tem expressão diferenciada em lesões de alto grau, NIC III, e que assim como o miR-203, com maiores avaliações e um maior número amostras, podem ser fortes candidatos na identificação de lesões cervicais.

Mesmo não sendo encontrado correlação entre os perfis de expressão do miR-203 e do oncogene E5, não é ideal descartar a ação dessa oncoproteína na expressão do miR-203, mesmo que de forma indireta.

8. Referências Bibliográficas

- Amaral, R. G., Manrique, E. J. C., Guimarães, J. V., Sousa, P. J. D., Mignoli, J. R. Q., Xavier, A. D. F., & Oliveira, A. (2008). Influência da adequabilidade da amostra sobre a detecção das lesões precursoras do câncer cervical. *Rev. bras. ginecol. obstet*, 30(11), 556-560.
- Araibi EH, Marchetti B, Ashrafi GH, Campo MS (2004). Downregulation of major histocompatibility complex class I in bovine papillomas. *J. Gen. Virol.* 85:2809–2814.
- Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B, Campo MS (2006). E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *Int. J. Cancer* 119:2105–2112.
- Au Yeung CL, Tsang WP, Tsang TY, Co NN, Yau PL and Kwok TT (2010) HPV-16 E6 upregulation of DNMT1 through repression of tumor suppressor p53. *Oncol Rep* 24: 1599-1604.
- Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., & de Villiers, E. M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401(1), 70-79.
- Bian, K., Fan, J., Zhang, X., Yang, X. W., Zhu, H. Y., Wang, L., ... & Zhang, J. (2012). MicroRNA-203 leads to G1 phase cell cycle arrest in laryngeal carcinoma cells by directly targeting survivin. *FEBS letters*, 586(6), 804-809.
- Borzacchiello G, Roperto F, Campo MS and Venuti A (2010). 1st international workshop on papillomavirus E5 oncogene -a report. *Virology* 408: 135-137.
- Botezatu A, Goia-Rusanu CD, Iancu IV, Huica I, Plesa A, Socolov D, Ungureanu C, Anton G (2011). Quantitative analysis of the relationship between microRNA-124a, -34b and -203 gene methylation and cervical oncogenesis *Molecular Medicine REPORTS* 4: 121-128.
- Brosh, R., Shalgi, R., Liran, A., Landan, G., Korotayev, K., Nguyen, G. H., ... & Goldstein, I. (2008). p53-repressed miRNAs are involved with E2F in a feed-forward loop promoting proliferation. *Molecular systems biology*, 4(1), 229.
- Bueno, M. J., de Castro, I. P., de Cedron, M. G., Santos, J., Calin, G. A., Cigudosa, J. C., ... & Malumbres, M. (2008). Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer cell*, 13(6), 496-506.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., ... & Vandesompele, J. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4), 611-622.
- Cao, L., Feng, C., Li, L., & Zuo, Z. (2012). Contribution of microRNA-203 to the isoflurane preconditioning-induced neuroprotection. *Brain research bulletin*, 88(5), 525-528.
- Catarino, R., Vassilakos, P., Tebeu, P. M., Schäfer, S., Bongoe, A., & Petignat, P. (2016). Risk factors associated with human papillomavirus prevalence and cervical neoplasia among Cameroonian women. *Cancer epidemiology*, 40, 60-66.
- Chaiwongkot, A., Vinokurova, S., Pientong, C., Ekalaksananan, T., Kongyingyoes, B., Kleebkaow, P., ... & von Knebel Doeberitz, M. (2013). Differential

- methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions. *International Journal of Cancer*, 132(9), 2087-2094.
- Chang JL, Tsao YP, Liu DW, Huang SJ, LeeWH, Chen SL (2001) The expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix. *Journal of Biomedical Science*;8:206–13.
- Chao, A., Wang, T. H., Lee, Y. S., Hsueh, S., Chao, A. S., Chang, T. C., ... & Lai, C. H. (2006). Molecular characterization of adenocarcinoma and squamous carcinoma of the uterine cervix using microarray analysis of gene expression. *International journal of cancer*, 119(1), 91-98.
- Cheung, T. H., Man, K. N. M., Yu, M. Y., Yim, S. F., Siu, N. S., Lo, K. W., ... & Worley Jr, M. J. (2012). Dysregulated microRNAs in the pathogenesis and progression of cervical neoplasm. *Cell Cycle*, 11(15), 2876-2884.
- Chung TK, Cheung TH, Huen NY (2009). Dysregulated microRNAs and their redicted targets associated with endometrioid endometrial adenocarcinoma in Hong Kong women. *Int J Cancer*. Mar15;124(6):1358-65.
- Craig, V. J., Cogliatti, S. B., Rehrauer, H., Wündisch, T., & Müller, A. (2011). Epigenetic silencing of microRNA-203 dysregulates ABL1 expression and drives Helicobacter-associated gastric lymphomagenesis. *Cancer research*, 71(10), 3616-3624.
- Da Silva, M. B., Chagas, B. S., Guimaraes, V., Katz, L. M. C., Felix, P. M., Miranda, P. M., ... & Stocco, R. C. (2009). HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 8(4), 1437-1443.
- Davis-Dusenbery BN and Hata A (2010) MicroRNA in cancer: the involvement of aberrant microRNA biogenesis regulatory pathways. *Genes Cancer* 1: 1100-1114.
- Derchain SFM, Longatto FA, Syrjanen KJ (2005) Neoplasia intra-epitelial cervical: diagnóstico e tratamento. *Rev Bras Ginecol Obstet* 27:425-33.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006). Oncomirs — microRNAs with a role in Cancer. *Nature Reviews Cancer* 6, 259-269.
- Fehrmann F, Laimins LA (2003). Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 22:5201–5207.
- Frazer IH (2004) Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 4(1):46-54.
- French, D., Belleudi, F., Mauro, M. V., Mazzetta, F., Raffa, S., Fabiano, V., ... & Torrisi, M. R. (2013). Expression of HPV16 E5 down-modulates the TGFbeta signaling pathway. *Mol Cancer*, 12(1), 38.
- Gocze, K., Gombos, K., Juhasz, K., Kovacs, K., Kajtar, B., Benczik, M., ... & Ember, I. (2013). Unique microRNA expression profiles in cervical cancer. *Anticancer research*, 33(6), 2561-2567.
- Greco, D., Kivi, N., Qian, K., Leivonen, S. K., Auvinen, P., & Auvinen, E. (2011). Human papillomavirus 16 E5 modulates the expression of host microRNAs. *PloS one*, 6(7), e21646.
- Gruener, M., Bravo IG, Momburg F, Alonso A, Tomakidi P (2007). The E5 protein of the human papillomavirus type 16 downregulates HLA-I surface expression in calnexin-expressing but not in calnexin-deficient cells. *Viol. J.* 4:116.
- Gurgel AP, Chagas BS, do Amaral CM, Nascimento KC, Leal LR, Silva Neto Jda C, Cartaxo Muniz MT, de Freitas AC (2015). Prevalence of Human

- Papillomavirus Variants and Genetic Diversity in the L1 Gene and Long Control Region of HPV16, HPV31, and HPV58 Found in North-East Brazil. *Biomed Res Int.* 2015:130828.
- Häfner, N., Driesch, C., Gajda, M., Jansen, L., Kirchmayr, R., Runnebaum, I. B., & Dürst, M. (2008). Integration of the HPV16 genome does not invariably result in high levels of viral oncogene transcripts. *Oncogene*, 27(11), 1610-1617.
- Hu, X., Schwarz, J. K., Lewis, J. S., Huettner, P. C., Rader, J. S., Deasy, J. O., ... & Wang, X. (2010). A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis. *Cancer research*, 70(4), 1441-1448.
- Hu, L., & Ceresa, B. P. (2009). Characterization of the Plasma Membrane Localization and Orientation of HPV16 E5 for Cell-Cell Fusion. *Virology*, 393(1), 135–143.doi:10.1016/j.virol.2009.07.034
- Ikenaga, N., Ohuchida, K., Mizumoto, K., Yu, J., Kayashima, T., Sakai, H., ... & Tanaka, M. (2010). MicroRNA-203 expression as a new prognostic marker of pancreatic adenocarcinoma. *Annals of surgical oncology*, 17(12), 3120-3128.
- INCA (2014) Estimativa 2014: Incidência de cancer no Brasil. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer, Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>.
- INCA (2016) Estimativa 2016: Incidência do câncer no Brasil. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer, Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>>.
- Jianguo HE, Yangjia D, Gang Y, Wenyi X (2013).MicroRNA-203 Down-Regulation Is Associated With Unfavorable Prognosis in Human Glioma. *Journal of Surgical Oncology* 108:121–125.
- Jiménez-wences H, Peralta-zaragoza O, Fernández-tilapa G (2014). Methylation of micrnas in cervical cancer. *Oncology Reports* 31: 2467-2476.
- Karlsen, F., Kalantari, M., Jenkins, A., Pettersen, E., Kristensen, G., Holm, R., ... & Hagmar, B. (1996). Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *Journal of clinical microbiology*, 34(9), 2095-2100.
- Kay P, Meehan K, Willianson, A (2002). The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomaviruses in samples containing low copy numbers of viral DNA. *J Virol Methods*, v. 105, n. 1, p. 159-70.
- Kiani, S. J., Malekshahi, S. S., Ghalejoogh, Z. Y., Ghavvami, N., Jandaghi, N. Z. S., Shahsiah, R., ... & Yavarian, J. (2015). Detection and Typing of Human Papilloma Viruses by Nested Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay in Cervical Cancer. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(12).
- Kivi N, Greco D, Auvinen P, Auvinen E (2008) Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene* 27: 2532–2541.
- Lee, J. W., Choi, C. H., Choi, J. J., Park, Y. A., Kim, S. J., Hwang, S. Y., ... & Bae, D. S. (2008). Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 14(9), 2535-2542.
- Leitao, M. D. C. G., Coimbra, E. C., de Lima, R. D. C. P., de Lima Guimaraes, M., de Andrade Heraclio, S., Neto, J. D. C. S., & de Freitas, A. C. (2014). Quantifying mRNA and MicroRNA with qPCR in Cervical Carcinogenesis: A Validation of Reference Genes to Ensure Accurate Data. *PloS one*, 9(11), e111021.

- Lena, A. M., R. Shalom-Feuerstein, P. Rivetti di Val Cervo, D. Aberdam, R. A. Knight, G. Melino, and E. Candi. (2008). miR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63. *Cell Death Differ.* 15:1187–1195.
- Leonard, S., Collins, S., Pereira, M., Diyaf, A., Constandinou-Williams, C., Young, L., ... & Woodman, C. (2012). Oncogenic human papillomavirus imposes an instructive pattern of DNA methylation changes which parallel the natural history of cervical HPV infection in young women. *Carcinogenesis*, bgs157.
- Li, J., Chen, Y., Zhao, J., Kong, F., & Zhang, Y. (2011). miR-203 reverses chemoresistance in p53-mutated colon cancer cells through downregulation of Akt2 expression. *Cancer letters*, 304(1), 52-59.
- Liao S, Deng D, Zhang W, Hu X, Wang W, Wang H, Lu Y, Wang S, Meng L, MA D (2013). Human papillomavirus 16/18 E5 promotes cervical cancer cell proliferation, migration and invasion *in vitro* and accelerates tumor growth *in vivo*. *ONCOLOGY REPORTS* 29: 95-102.
- Ling H, Fabbri M, Calin G A (2013). MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development nature reviews drug discovery vol 12 847-865.
- Lorenzon, L., Mazzetta, F., Venuti, A., Frega, A., Torrisi, M. R., & French, D. (2011). In vivo HPV 16 E5 mRNA: expression pattern in patients with squamous intra-epithelial lesions of the cervix. *Journal of Clinical Virology*, 52(2), 79-83.
- Lu-lu, S., Qiong, J., Hui, L., Xian-rong, Z., Zhi-qin, S., Xue-mei, C., ... & Yan, Z. (2012). Population-based study on the prevalence of and risk factors for human papillomavirus infection in Qujing of Yunnan province, Southwest China. *Virology journal*, 9(1), 1.
- Ma D, Zhang YY, Guo YL, Li ZJ, Geng L (2012) Profiling of microRNA-mRNA reveals roles of microRNAs in cervical cancer. *Chin Med J (Engl)*. Dec;125(23):4270-6.
- Marsh EE, Lin Z, Yin P, Milad M, Chakravarti D, Bulun SE (2008) Differential expression of microRNA species in human uterine leiomyoma versus normal myometrium. *Fertil Steril*. Jun;89(6):1771-6.
- Martinez I, Gardiner AS, Board KF, Monzon FA, Edwards RP, Khan SA (2008). Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells 1 *Oncogene* 27, 2575–2582.
- McBride, A. A., Sakakibara, N., Stepp, W. H., & Jang, M. K. (2012). Hitchhiking on Host Chromatin: how Papillomaviruses Persist. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819(7), 820–825. doi:10.1016/j.bbagr.2012.01.011
- McKenna, D. J., McDade, S. S., Patel, D., & McCance, D. J. (2010). MicroRNA 203 expression in keratinocytes is dependent on regulation of p53 levels by E6. *Journal of virology*, 84(20), 10644-10652.
- Melar-New M, Laimins LA (2010) Human papillomaviruses modulate expression of microRNA 203 upon epithelial differentiation to control levels of p63 proteins. *J Virol* 84: 5212–5221.
- Miura S, Kawana K, Schust DJ, Fujii T, Yokoyama T, Iwasawa Y, Nagamatsu T, Adachi K, Tomio A, Tomio K, Kojima S, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y (2010). CD1d, a Sentinel Molecule Bridging Innate and Adaptive Immunity, Is Downregulated by the Human Papillomavirus (HPV) E5 Protein: a Possible Mechanism for Immune Evasion by HPV. *JOURNAL OF VIROLOGY*. p. 11614–11623
- Moody CA, Laimins LA (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 10: 550-560.

- Muñoz, N., Castellsagué, X., Berrington de Gonzales, A., & Gismann, L. E. (2006). VPH en la etiología del cáncer humano. *Vaccine*, 24.
- Muralidhar B, Goldstein LD, Ng G, Winder DM, Palmer RD, Gooding EL, Barbosa-Morais NL, Mukherjee G, Thorne NP, Roberts I et al. (2007) Global microRNA profiles in cervical squamous cell carcinoma depend on Drosha expression levels. *J. Pathol.* 212, 368–377.
- Muto V, Stellacci E, Lamberti AG, Perrotti E, Carrabba A, Matera G, Sgarbanti M, Battistini A, Liberto MC, Foca` A (2011). Human Papillomavirus Type 16 E5 Protein Induces Expression of Beta Interferon through Interferon Regulatory Factor 1 in Human Keratinocytes. *JOURNAL OF VIROLOGY*.p. 5070–5080.
- Nielson, C.M.; Harris, R.B.; Flores, R.; Abrahamsen, M.; Papenfuss, M.R.; Dunne, E.F.; Markowitz, L.E.; Giuliano, A.R.c (2009) Multiple-type human papillomavirus infection in male anogenital sites: Prevalence and associated factors. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*18,1077–1083.
- Noguchi, S., Mori, T., Otsuka, Y., Yamada, N., Yasui, Y., Iwasaki, J., ... & Akao, Y. (2012). Anti-oncogenic microRNA-203 induces senescence by targeting E2F3 protein in human melanoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(15), 11769-11777.
- Ørom, U. A., Lim, M. K., Savage, J. E., Jin, L., Saleh, A. D., Lisanti, M. P., & Simone, N. L. (2012). MicroRNA-203 regulates caveolin-1 in breast tissue during caloric restriction. *Cell Cycle*, 11(7), 1291-1295.
- Pedroza-Torres A, López-Urrutia E, García-Castillo V, Jacobo-Herrera N, Herrera LA, Peralta-Zaragoza O, López-Camarillo C, De Leon DC, Fernández-Retana J, Cerna-Cortés JF, Pérez-Plasencia C. (2014). MicroRNAs in Cervical Cancer: Evidences for a miRNA Profile Deregulated by HPV and Its Impact on Radio-Resistance. *Molecules* , 19, 6263-6281.
- Peltier HJ, Latham GJ (2008) Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 14: 844–852.
- Pereira PM, Marques JP, Soares AR, Carreto L, Santos MA (2010) MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *PLoS One* 5(7):e11780.
- Pinto AP, Crum CP, Hirsch MS (2010) Molecular markers of early cervical neoplasia. *Diagn Histopathol* 16: 445–454.
- Qian, K., Pietilä, T., Rönty, M., Michon, F., Frilander, M. J., Ritari, J., Auvinen, E. (2013). Identification and Validation of Human Papillomavirus Encoded microRNAs. *PLoS ONE*, 8(7), e70202.
- Rajkumar T, Sabitha K, Vijayalakshmi N, Sundersingh S, Bose MV, et al (2011) Identification and validation of genes involved in cervical tumorigenesis. *BMC Cancer*, 11:80.
- Rao, Q., Zhou, H., Peng, Y., Li, J., & Lin, Z. (2012). Aberrant microRNA expression in human cervical carcinomas. *Medical oncology*, 29(2), 1242-1248.
- Reshmi G and Radhakrishna PM (2012) Interplay Between HPV Oncoproteins and MicroRNAs in Cervical Cancer, Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - Research aspects, Davy Vanden Broeck (Ed.), ISBN: 978-953-307-855-7, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/interplay-between-hpv-oncoproteins-nd-micrnas-in-cervical-cancer>.
- Roberts AP, Jopling CL (2010) Targeting viral infection by microRNA inhibition. *Genome Biol* 11: 201.

- Rogovskaya, S. I., Shabalova, I. P., Mikheeva, I. V., Minkina, G. N., Podzolkova, N. M., Shipulina, O. Y., ... & Dartell, M. (2013). Human papillomavirus prevalence and type-distribution, cervical cancer screening practices and current status of vaccination implementation in Russian Federation, the Western countries of the former Soviet Union, Caucasus region and Central Asia. *Vaccine*, 31, H46-H58.
- Rosty, C., Sheffer, M., Tsafrir, D., Stransky, N., Tsafrir, I., Peter, M., ... & Thiery, J. P. (2005). Identification of a proliferation gene cluster associated with HPV E6/E7 expression level and viral DNA load in invasive cervical carcinoma. *Oncogene*, 24(47), 7094-7104.
- Saavedra KP, Brebi PM and Roa JC (2012) Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. *Clin Epigenetics* 4: 13.
- Sapp, M. and Bienkowska-Haba, M. (2009), Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS Journal*, 276: 7206–7216. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07400.x
- Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ and Shimizu K (2011) MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J* 278: 1598-1609.
- Shen, Y., Li, Y., Ye, F., Wang, F., Wan, X., Lu, W., & Xie, X. (2011). Identification of miR-23a as a novel microRNA normalizer for relative quantification in human uterine cervical tissues. *Experimental & molecular medicine*, 43(6), 358-366.
- Sheng J and Zhang Wei-yuan (2010) Identification of biomarkers for cervical cancer in peripheral blood lymphocytes using oligonucleotide microarrays. *Chin Med J*;123:1000-1005 .
- Sonkoly E, Wei T, Janson PCJ, Sa`a`f A, Lundeberg L, et al (2007) MicroRNAs: Novel Regulators Involved in the Pathogenesis of Psoriasis? *PLoS ONE* 2(7): e610.
- Sousa, A.P (2011) Cancro de colo de útero: Tendências e estudos recentes. Monografia; Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa.
- Steenbergen RDM, Wilde J, Wilting SM, Brink AATP, Snijders PJF and Meijer CJLM (2005) HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol* 32:25-33.
- Suzuki, H. I., K. Yamagata, K. Sugimoto, et al. (2009) Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* 460: 529–534.
- Trottier, H.; Mahmud, S.; Costa, M.C.; Sobrinho, J.P.; Duarte-Franco, E.; Rohan, T.E.; Ferenczy, A.; Villa, L.L.; Franco, E.L. (2006) Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 15, 1274–1280
- Truong, A. B., and P. A. Khavari (2007) Control of keratinocyte proliferation and differentiation by p63. *Cell Cycle* 6:295–299
- Van Tine, B. A., Kappes, J. C., Banerjee, N. S., Knops, J., Lai, L., Steenbergen, R. D., ... & Moen, P. T. (2004). Clonal selection for transcriptionally active viral oncogenes during progression to cancer. *Journal of virology*, 78(20), 11172-11186.
- Viticchie` G, Lena AM, Latina A, et al.(2011). MiR-203 controls proliferation, migration and invasive potential of prostate cancer cell lines. *Cell Cycle*;10:1121–1131.
- Wang X, Tang S, Le SY, Lu R, Rader JS, Meyers C, Zheng ZM (2008). Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS One*, 3,e2557.

- Wei T., Orfanidis K., Xu N., Janson P., Sta^ohle M., Pivarcsi A., Sonkoly E. (2010). The expression of microRNA-203 during human skin Morphogenesis. *Experimental Dermatology*; 19: 854-856.
- Wilting SM, Snijders PJ, Verlaat W, Jaspers A, van de Wiel MA, van Wieringen WN, Meijer GA, Kenter GG, Yi Y, le Sage C et al. (2013). Altered microRNA expression associated with chromosomal changes contributes to cervical carcinogenesis. *Oncogene*, 32, 106–116.
- Witten D, Tibshirani R, Gu SG, Fire A, Lui WO (2010). Ultra-high throughput sequencing-based small RNA discovery and discrete statistical biomarker analysis in a collection of cervical tumours and matched controls. *BMC Biol.*, 8, 58.
- Woodman CB, Collins SI, Young LS. (2007) The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*; 7 : 11-22.
- Wong YF, Sahota DS, Cheung TH, et al (2006) Gene expression pattern associated with radiotherapy sensitivity in cervical cancer. *Cancer J*;12:189–93.
- Yi, R., M. N. Poy, M. Stoffel, and E. Fuchs. (2008). A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature* 452:225–229.
- Yao T, Rao Q, Liu L, et al: Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in cervical cancer. *Virology* 10: 175, 2013
- Yu H, Lu J, Zuo L, et al.(2012). Epstein–Barr virus downregulates microRNA 203 through the oncoprotein latent membrane protein 1: A contribution to increased tumor incidence in epithelial cells. *J Virol*;86:3088–3099.
- Yu, S.L., Chan, P. K., Wong, C.-K., Szeto, C.-C., Ho, S. C., So, K., Tam, L.S. (2012). Antagonist-mediated down-regulation of toll-like receptors increases the prevalence of human papillomavirus infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, 14(2), R80. doi:10.1186/ar3803
- Yuan Y, Zeng ZY, Liu XH, et al.(2011). MicroRNA-203 inhibits cell proliferation by repressing DNp63 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* ;11:57.
- Zhang F, Yang Z, Cao M, Xu Y, Li J, Chen X, Gao Z, Xin J, Zhou S, Zhou Z, Yang Y, Sheng W, Zeng Y (2014).MiR-203 suppresses tumor growth and invasion and down-regulates MiR-21 expression through repressing Ran in esophageal cancer. *Cancer Letters* 342 121–129.
- Zhao S, Yao DS, Chen JY, Ding N (2013). Aberrant expression of miR-20a and miR-203 in cervical cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 14, 2289–2293.
- Zheng ZM and Wang X: Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses. *Biochim Biophys Acta* 1809: 668-677, 2011.
- Zhu X, Er K, Mao C, Yan Q, Xu H, Zhang Y, Zhu J, Cui F, Zhao W, Shi H (2013). miR-203 suppresses tumor growth and angiogenesis by targeting VEGFA in cervical cancer. *Cell Phys. Biochem.*,32, 64–73.
- zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2: 342-350.

9. Apêndice



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convido a Sr. a para participar, como voluntária, da pesquisa “*Caracterização do perfil de expressão molecular associado à infecção pelo papilomavirus humano: identificação de novos marcadores moleculares e alvos terapêuticos*”.

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, Sla 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO MOLECULAR ASSOCIADO À INFECÇÃO PELO PAPILOMAVIRUS HUMANO: IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MARCADORES MOLECULARES E ALVOS TERAPÊUTICOS.

Pesquisador Responsável: Pro. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Endereço/Telefone/e-mail para contato (inclusive ligações a cobrar):

Av.Prof. Moraes Rego, s/n – Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE), Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco , CEP 50670-901, Fone: 2126-8520, e-mail: acf_ufpe@yahoo.com.br

Pesquisadores participantes:

- Eliane Campos Coimbra
- Maria da Conceição Gomes Leitão

Telefones para contato: 2126-8520

OBJETIVOS: Avaliar o perfil de moléculas envolvidas no processo da carcinogênese cervical para a identificação de novos biomarcadores para diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO: Se concordar em participar da pesquisa, você responderá a um questionário (perguntas para marcar um “x”) sobre alguns hábitos de vida, que podem facilitar a infecção pelo HPV e o aparecimento de lesões no colo do útero. Nesse questionário não haverá o seu nome, e todas as informações que você der serão mantidas em sigilo (segredo), ou seja, só terão acesso a essas informações os pesquisadores envolvidos na pesquisa. Além disso, você permitirá a utilização, de uma amostra da biopsia e do sangue, que já serão coletados de você como parte da rotina de exames para a prevenção do câncer cervical. Nós utilizaremos uma parte das amostras de sangue e biopsia para desenvolver o nosso estudo que tem como objetivo, encontrar uma melhor forma de prevenção e tratamento do câncer cervical.

RISCOS E DESCONFORTOS: A paciente pode se sentir constrangida em responder ao questionário referente aos fatores de risco para desenvolvimento do câncer cervical. Os pesquisadores envolvidos na aplicação do questionário explicarão primeiramente do que se trata o projeto e a importância da colaboração da paciente para o estudo, deixando-a a vontade para decidir se deseja ou não fazer parte do estudo, de forma a minimizar esse desconforto. O risco na coleta de sangue ou biopsia é proveniente do próprio procedimento de rotina para prevenção do câncer cervical, não estando relacionado ao presente projeto de pesquisa. Na coleta de sangue a paciente poderá sentir um desconforto, como ardor durante a picada com a agulha e também pode aparecer um hematoma no local onde foi realizada a coleta (mancha azulada que desaparece em poucos dias, geralmente não há complicações.), mas caso ocorra algum desses sintomas o profissional responsável irá tratar de forma adequada. Em relação à coleta da biopsia a paciente pode sentir um desconforto no local em que será retirada a biopsia, mas caso ocorra o médico irá realizar o tratamento adequado.

BENEFÍCIOS: Será possível retribuir a colaboração voluntária das pacientes, com a detecção e identificação dos tipos de HPVs de alto risco mais prevalentes na nossa região, presente nas amostras coletadas, auxiliando no diagnóstico preventivo do câncer cervical.

CUSTO/REEMBOLSO PARA O PARTICIPANTE: Não haverá nenhum gasto com sua participação. As consultas, exames, tratamentos serão totalmente gratuitos, não recebendo nenhuma cobrança com o que será realizado. Você também não receberá nenhum pagamento com a sua participação. Você pode retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer prejuízo da continuidade do acompanhamento/ tratamento usual.

CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA: Todos os dados referentes a presente pesquisa serão armazenados no servidor da plataforma de genômica e expressão gênica do Centro

de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, sob responsabilidade do Prof. Antonio Carlos de Freitas, com acesso restrito aos pesquisadores, durante o período de vigência do projeto.

Assinatura do Pesquisador Responsável:

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG/CPF/ _____, abaixo assinado, _____ concordo em participar do estudo, como sujeito. Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a) _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data _____

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável:

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

02 testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

10. Anexo I

Expression profile of MicroRNA-203 and its Δ Np63 target in cervical carcinogenesis

Eliane Campos Coimbra^b, Maria da Conceicao Gomes Leitao^b, Marconi Rego Barros Junior^b, Talita Helena Araujo de Oliveira^b, Jacinto da Costa Silva Neto^c, Antonio Carlos de Freitas^b

a. Biological Sciences Institute (ICB), University of Pernambuco, Brazil. 7

b. Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy (LEMTE), Department of Genetics, Center for Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Brazil.

c. Molecular and Cytological Research Laboratory, Department of Histology, Federal University of Pernambuco,

Abstract

Host molecules disturbed by HPV oncoproteins have been shown to be potential biomarkers of cervical carcinogenesis and represent an alternative or supplementary aid to cytological testing and HPV detection. The miR-203 and one of its targets, the Δ Np63, are known to be host molecules that interact with each other to control the proliferation and differentiation of keratinocytes, and both, have been found to be dysregulated in many cancers. With regard to the role of p63 and miR-203 in cervical carcinoma, this is not well understood yet, and we have thus decided to evaluate the changes of expression of both in cervical carcinogenesis. Additionally, the expression levels of both were correlated to test whether Δ Np63 mRNA was affected by miR-203. This was carried out by obtaining qPCR data from 95 cervical biopsies. We found that miR-203 and Δ Np63 displayed a similar expression pattern across cervical tissues and both targets showed statistically significant differences between LSIL x HSIL; HSIL x Cancer. In conclusion, we have found that the level changes in Δ Np63 mRNA and miR-203 in cervical samples have the potential to differentiate the stages of the cervical carcinogenesis. Additionally, we did not observe an inverse correlation between Δ Np63 mRNA and miR-203 levels as expected, but instead a positive correlation in cervical tissues which suggests the possible existence of some indirect pathways. However, we suggest further studies to clarify the role of Δ Np63 and miR-203 in carcinogenesis in order to determine their application in novel strategies for diagnosis and molecularly targeted therapies.

Key words: Δ Np63, miR-203, cervical carcinogenesis, qPCR.

11. Anexo II

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências da Saúde / UFPE-CCS

PROJETO DE PESQUISA

Título: Caracterização do perfil molecular associado à infecção pelo Papilomavirus Humano: identificação de novos marcadores moleculares e alvos terapêuticos.

Área Temática:

Pesquisador: Antonio Carlos de Freitas

Versão: 2

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

CAAE:

3606212.7.0000.5208

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 67719

Data da Relatoria: 23/07/2012

Apresentação do Projeto:

O documento intitulado “Caracterização do perfil molecular associado à infecção pelo Papilomavirus Humano: identificação de novos marcadores moleculares e alvos terapêuticos” trata-se de projeto de pesquisa coordenado pelo Dr. Antonio Carlos de Freitas, Professor do Departamento de Genética da UFPE. A infecção pelos papilomavirus humanos (HPVs) é uma das principais DSTs que acomete a população mundial e está diretamente relacionada com o desenvolvimento do câncer de colo de útero. No Brasil, o câncer cervical produz uma média de 2,5 óbitos/100.000 indivíduos. O teste Papanicolaou convencional constitui-se na principal estratégia utilizada em programas de rastreamento para o controle do câncer do colo do útero. Porém, este tipo de diagnóstico ainda apresenta inconsistências na interpretação das atipias celulares correlacionadas a cada tipo de lesão. Estudos recentes têm tentado esclarecer os vários e complexos mecanismos envolvidos no câncer cervical, através da expressão de genes e microRNAs humanos em tecidos normais e tumorais do colo uterino. As discordâncias nos resultados apresentados até o momento podem estar relacionadas às diferentes plataformas e métodos utilizados pelos laboratórios, e à variabilidade apresentadas entre as amostras do grupo controle usadas como referência, o que pode ser devido à variabilidade étnica dos indivíduos estudados. No Brasil, em especial na região nordeste ainda não foi realizado nenhum estudo referente à caracterização da expressão de genes, nem de microRNAs, como também da correlação de ambos na carcinogênese cervical. Neste sentido, este projeto tem como objetivo avaliar o perfil de expressão molecular no processo da carcinogênese cervical, para a identificação de novos biomarcadores para o diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário

Avaliar o perfil de expressão molecular no processo da carcinogênese cervical para a identificação de novos biomarcadores para diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer.

Objetivos secundários

Identificar moléculas diferencialmente expressas em amostras normais, NICI, NICII, NICIII e carcinoma cervical;
Validar as moléculas identificadas;

Indicar potenciais biomarcadores para o diagnóstico, prognóstico e alvos terapêuticos;

Apontar novas metodologias diagnósticas, prognósticas e terapêuticas utilizando os biomarcadores.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios estão bem definidos

Riscos:A paciente pode se sentir constrangida em responder ao questionário referente aos fatores de risco para desenvolvimento do câncer cervical. Os pesquisadores envolvidos na aplicação do questionário explicarão primeiramente do que se trata o projeto e a importância da colaboração da paciente para o estudo, deixando-a a vontade para decidir se deseja ou não fazer parte do estudo, de forma a minimizar esse desconforto. O risco na coleta de sangue ou biópsia é proveniente do próprio procedimento de rotina para prevenção do câncer cervical, não estando relacionado ao presente projeto de pesquisa. Na coleta de sangue a paciente poderá sentir um desconforto, como ardor durante a picada com a agulha e também pode aparecer um hematoma no local onde foi realizada a coleta (mancha azulada que desaparece em poucos dias. geralmente não há complicações.), mas caso ocorra algum desses sintomas o profissional responsável irá tratar de forma adequada. Em relação à coleta da biópsia a paciente pode sentir um desconforto no local em que será retirada a biópsia, mas caso ocorra o médico irá realizar o tratamento adequado.

Benefícios:Será possível retribuir a colaboração das pacientes, com a detecção e identificação dos tipos de HPVs de alto risco mais prevalentes na nossa região, presente nas amostras coletadas, auxiliando no diagnóstico preventivo do câncercervical.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O Presente projeto é um estudo de coorte transversal e prospectivo, no qual serão obtido amostras clínicas de 600 pacientes: Serão utilizadas amostras de biópsias, conização cervical e sangue de pacientes apresentando os vários graus da neoplasia cervical (NIC I, II, III) e o carcinoma. Serão incluídas no estudo amostras controles do tecido cervical normal. Todas as amostras clínicas serão coletadas em RNAlater (Ambion, Austin, EUA; Cat:AM7021) e armazenadas em freezer a -80 C°. Detecção e genotipagem do HPV: o DNA das amostras será extraído utilizando-se o GenomicPrep Blood DNA isolation kit (Amersham Bioscience) de acordo com as instruções do fabricante. A detecção do DNA dos tipos de HPV e genotipagem serão efetuadas por PCR. A Análise da expressão dos genes nas amostras clínicas será realizada através das seguintes etapas: Extração de RNA total, e Microarray para obtenção do cDNA e realização da RT-PCR e produção do cRNA que será purificado e quantificado em NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop Technologies). Validação da expressão dos genes por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Os critérios de inclusão e exclusão e estão adequadamente descritos. O cronograma é compatível com os objetivos da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram anexadas as cartas de anuência do chefe do Ambulatório da Mulher do Instituto de Medicina Integral Fernando Figueira (IMIP) e do chefe do serviço de Ginecologia do HC e do diretor de Pesquisa, Ensino e Extensão do Hospital das Clínicas. O orçamento é fomentado por projeto aprovado pela Capes, de acordo com documento anexo. Foram anexados os TCLE para adultos e menores.

Recomendações:

não há recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O trabalho é relevante, traz importante contribuição científica. Cumpriu com as pendências podendo ser aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão para início da coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, por meio de ofício impresso, após a entrega do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.

RECIFE, 06 de Agosto de 2012

Assinado por:

GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO