



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

MARCONI REGO BARROS JÚNIOR

**INVESTIGAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DO ONCOGENE E5 DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO E DE SEUS ALVOS CAVEOLINA-1,
GANGLIOSÍDEO-1 E COX-2 NA CARCINOGENESE CERVICAL**

Recife
2018

MARCONI REGO BARROS JÚNIOR

**INVESTIGAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DO ONCOGENE E5 DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO E DE SEUS ALVOS CAVEOLINA-1,
GANGLIOSÍDEO-1 E COX-2 NA CARCINOGENESE CERVICAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Inovação Terapêutica da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Inovação
Terapêutica

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientador: Profº Dr. Antonio Carlos de Freitas

Recife
2018

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Barros Júnior, Marconi Rego

Investigação do perfil de expressão do oncogene E5 do Papilomavírus humano e de seus alvos Caveolina-1, Gangliosídeo-1 e COX-2 na carcinogênese cervical / Marconi Rego Barros Junior.- 2018.
135 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Antônio Carlos de Freitas
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 2018.

Inclui referências e apêndices.

1. Câncer cervical 2. Papilomavírus humano 3. Biomarcadores
I. Freitas, Antônio Carlos de (orient.) II. Título

616.99465

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-003

MARCONI REGO BARROS JÚNIOR

**INVESTIGAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DO ONCOGENE E5 DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO E DE SEUS ALVOS CAVEOLINA-1,
GANGLIOSÍDEO-1 E COX-2 NA CARCINOGENESE CERVICAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 22 / 10 / 2018.

BANCA EXAMINADORA

Profº Dr. Antonio Carlos de Freitas (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº Marcos André Cavalcanti Bezerra (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº Dr. Jacinto da Costa Silva Neto (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº Dr. Tercilio Calsa Jr. (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esta obra a minha amada esposa e família, além de a todos aqueles que estudam, trabalham e se esforçam para oferecer um futuro digno e próspero a um país em constante crise, elevada intolerância, hipocrisia e decadência intelectual e moral. O Brasil merece ser soberano e fazer valer os dizeres positivistas tão bem oportunamente gravados em sua belíssima bandeira do verde predominante das matas, do amarelo vivo das suas riquezas, do azul do seu céu limpo e águas abundantes e das estrelas refulgentes de cada estado e do Distrito Federal: Ordem e Progresso.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde, sensatez e paz em todos os momentos; foi certamente devido a fé Nele que consegui superar esse grande desafio.

Ao meu orientador Prof. Antonio Carlos, pela orientação, pela amizade, pela confiança, pelo exemplo, pelas palavras de inteligência, serenidade e ensinamentos.

À Profa Cristiane Moutinho, por toda contribuição que vem prestando, pela inteligência, pelo exemplo, imediata empatia e pela amizade.

Ao LEMTE, PPGIT e UFPE, por serem a "casa" que me acolheu nesta jornada e pela FACEPE pelo apoio e incentivo financeiro.

Aos membros da banca pela contribuição a fim de aprimorar a qualidade deste trabalho.

Ao secretário do PPGIT Paulo, pela enorme solicitude, por sempre estar disposto a resolver todos problemas e por resolvê-los com muita eficiência e destreza.

A minha amada esposa Maria Luiza por estar ao meu lado em todos momentos, pela cumplicidade, pela superação de todos os obstáculos, por ser minha inspiração e a razão de querer ser melhor todos os dias.

A minha mãe Maria Henrique, minha irmã Valeska e ao meu irmãozinho Pedro que me passam apoio, orientação e boas energias.

Aos meus colegas de laboratório (LEMTE-UFPE), especialmente Humberto, Alanne, Guilherme, Kamylla, Rita, Herbert, Elias, Nayara e Bárbara, agradeço pela feliz convivência, e todo apoio direta ou indiretamente em minha jornada.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para esta conquista.

Em momentos como esse, eu não penso em toda a miséria, mas em toda a
beleza que ainda resta (FRANK, 1995).

RESUMO

O câncer cervical é o quarto câncer feminino mais comum no mundo, sendo consideravelmente mais frequente nos países em desenvolvimento. Seu principal agente etiológico é o hrHPV (papilomavírus humano de alto risco), cuja incidência é cerca de 99%. Entre os hrHPVs mais prevalentes estão os genótipos 16, 18, 58 e 31, estes dois últimos especificamente no Brasil, especialmente no Nordeste. Juntos causam o óbito de 5000 mil mulheres ao ano, contribuindo para um grave problema de saúde pública no país. O exame citológico de Papanicolaou, inserido nos programas públicos, é o principal método de rastreamento desse tipo de câncer. Entretanto, a aplicação deste método, como ele em si, apresenta desvantagens importantes como limitações na cobertura populacional e a falta de sensibilidade no estabelecimento do diagnóstico e da condição clínica. Desse modo, a investigação e estabelecimento do perfil de expressão de moléculas chave durante os estágios intraneoplásicos contribuirá para a determinação de um diagnóstico e prognóstico mais fidedignos, possibilitando a execução de condutas terapêuticas mais eficazes. Por isso, o objetivo desse trabalho foi buscar potenciais biomarcadores por meio do perfil de expressão do oncogene E5 e alguns de seus genes alvos na célula hospedeira – caveolina-1, gangliosídeo sintase-1 e ciclo-oxigenase-2 (COX-2) – por terem demonstrado, *in vitro*, atividades durante o processo carcinogênico cervical. Para isso, foram utilizadas biópsias de colo uterino em suas diferentes fases de lesão e extraídos os ácidos nucleicos a fim de detectar a presença, o genótipo viral e a expressão gênica (qPCR) dos genes citados. Os resultados da expressão do oncogene E5 dos genótipos virais 18 e 33 não foram considerados devido à baixa quantidade de amostras cervicais positivas para ambos. Para o genótipo 16 observou-se expressão significativamente maior do oncogene E5 nas lesões de NIC I e NIC III, enquanto para o HPV31 houve uma tendência de aumento também no estágio NIC III, embora sem significância estatística. Para o HPV58 assim como para o GM1 não houve expressão estatisticamente significativa em nenhum estágio. Para a Cav-1 e a COX-2 houve expressão significativa nas lesões de estágio NIC I. Foram vistas correlações diretas estatisticamente significante entre os oncogenes E5 dos HPVs 16 e 58 além de entre o E5 do HPV31 e o GM1, e o E5 do HPV58 e a Cav-1. Os genes alvos (Cav-1, GM1 e COX-2) apresentaram correlações diretas significativas entre si. Sendo assim, pôde-

se observar que ocorreram diferentes padrões de expressão que podem contribuir para o estabelecimento do grau histológico da lesão e no diagnóstico.

Palavras-chave: Biomarcadores. Caveolina-1. Gangliosídeo-1. Ciclo-oxigenase-2.

ABSTRACT

Cervical cancer is the fourth most common female cancer in the world, being considerably more prevalent in developing countries. Its main etiologic agent is hrHPV (high-risk human papillomavirus), whose incidence is about 99%. Among the most prevalent hrHPVs are genotypes 16, 18, 58 and 31, the latter two specifically in Brazil, especially in the Northeast region. Together they cause the death of 5000 thousand women a year, contributing to a serious public health problem in the country. Pap smear, inserted in public programs, is the main method of screening for this type of cancer. However, the application of this method, as itself, presents important disadvantages as limitations in the population coverage and the lack of sensitivity in establishing the diagnosis and the clinical condition. Thus, the investigation and establishment of the expression profile of key molecules during the intraneoplastic stages will contribute to the determination of a more reliable diagnosis and prognosis, allowing the execution of more effective therapeutic conducts. Therefore, the objective of this work was to search for potential biomarkers by establishing the expression profile of the E5 oncogene and some of its target genes in the host cell – caveolin-1, ganglioside synthase-1 and cyclooxygenase-2 (COX-2) – for have demonstrated, *in vitro*, activities during the cervical carcinogenic process. For this, uterine cervix biopsies were used in their different phases of injury and nucleic acids were extracted in order to detect the presence, the viral genotype, and the gene expression (qPCR) of the mentioned genes. The results of E5 oncogene expression of viral genotypes 18 and 33 were not considered, due to the low amount of positive cervical samples for both. For genotype 16, significantly higher expression of the oncogene E5 was observed in CIN I and CIN III lesions, whereas for HPV31 there was a tendency to increase also in the CIN III stage, although without statistical significance. For HPV58, as well as for GM1, there was no statistically significant expression at any stage. For Cav-1 and COX-2, there was significant expression in CIN I lesions. There were statistically significant direct correlations between E5 oncogenes of 16 and 58 genotypes, in addition to E5 of HPV31 and GM1, and E5 of HPV58 and Cav-1. As well, the target genes (Cav-1, GM1 and COX-2) showed significant direct correlations with each other. Thus, it was observed that different patterns of expression occurred and may contribute to the establishment of the histological grade and diagnosis.

Keywords: Biomarkers. Caveolin-1. Ganglioside-1. Cyclooxygenase-2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação do colo uterino	21
Figura 2 –	Epitélio escamoso estratificado não queratinizado	22
Figura 3 –	Zona de transformação e disposição histológica do colo uterino	22
Figura 4 –	Esquema do genoma viral	32
Figura 5 –	Espécies virais segundo o gênero alfa	33
Figura 6 –	Esquema da infecção pelo HPV através do tecido cervical ..	34
Figura 7 –	Mecanismos de imunoevasão viral, de mitogênese, angiogênese, anti-apoptótico e pró-inflamatório mediados por E5/16	38
Figura 8 –	Estrutura da caveolina	41
Figura 9 –	Estrutura e composição do complexo caveolae <i>lipid raft</i>	43
Figura 10 –	Internalização da caveolae	45
Figura 11 –	Vias de sinalização que sofrem interferência da caveolina-1	51
Figura 12 –	Estrutura dos gangliosídeos-1, -2 e -3	55
Figura 13 –	Biossíntese do gangliosídeo-1	56
Figura 14 –	Principais receptores de tirosina quinase modulados pelo GM1 e outros gangliosídeos	57
Figura 15 –	Região promotora do gene da COX-2	61
Figura 16 –	Genes alvos do NF- κ B envolvidos no desenvolvimento e progressão do câncer.....	64
Figura 17 –	Corrida eletroforética de produtos da PCR do par de <i>primers</i> My09/11 (primeira fileira) e da β -actina (segunda fileira)	75
Figura 18 –	Genotipagem das amostras	76
Figura 19 –	Níveis de expressão do oncogene E5 (HPV16)	77
Figura 20 –	Síntese de interferência e vias de sinalização	79
Figura 21 –	Níveis de expressão do oncogene E5 (HPV31)	80
Figura 22 –	Níveis de expressão do oncogene E5 (HPV58)	81
Figura 23 –	Níveis de expressão do oncogenes E5	81
Figura 24 –	Níveis de expressão da caveolina-1	82

Figura 25 –	Padrão de expressão gênica da cav-1 na literatura.....	84
Figura 26 –	Padrão de expressão proteica da cav-1 na literatura	84
Figura 27 –	Níveis de expressão da gangliosídeo sintase-1	85
Figura 28 –	Padrão de expressão gênica da GM1 sintase na literatura ..	86
Figura 29 –	Padrão de expressão proteica da GM1 sintase na literatura	87
Figura 30 –	Níveis de expressão da COX-2	88
Figura 31 –	<i>Stromal cell-centered HPV-related carcinogenesis hypothesis</i>	96
Figura 32 –	Papel das células estromais	97
Figura 33 –	Interferência da oncoproteína E5 nas cascatas de sinalização do EGF-R e TGF- β	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Efeitos sobre a resposta imune causados pelos oncogenes virais	26
Quadro 2 –	Padrões celulares de cada estágio pré-neoplásico e carcinoma	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Expectativa de regressão/progressão de lesões pré-neoplásicas	24
Tabela 2 –	Classificação do estadiamento do câncer cervical pelo sistema FIGO	27
Tabela 3 –	Influência da oncoproteína E5 (HPV16) sobre o organismo hospedeiro	39
Tabela 4 –	Funções da caveolina-1	46
Tabela 5 –	Papel da caveolina-1 nos diversos tipos de câncer	49
Tabela 6 –	Vias de ativação da expressão gênica da COX-2 de ocorrência ou de possível ocorrência no câncer cervical	61
Tabela 7 –	Atividades e efeitos pró-carcinogênicos da COX-2 e PGE ₂ ..	64
Tabela 8 –	Distribuição histopatológica e genotípica das amostras coletadas	69
Tabela 9 –	Relação de <i>primers</i> utilizados para genotipagem e qPCRs ..	73
Tabela 10 –	Expressão da COX-2 no câncer cervical	91
Tabela 11 –	Correlações entre a expressão dos genes avaliados	99
Tabela 12 –	Correlações estatisticamente significantes x estágios da progressão carcinogênica	100

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
AIS	Adenocarcinoma <i>in situ</i>
ASC	Células escamosas atípicas
ASC-H	Células escamosas atípicas de significado indeterminado que não pode excluir HSIL
ASCUS	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
CAF	<i>Cancer associated fibroblasts</i> (fibroblastos associados ao câncer)
Cav-1	Caveolina-1
CG	Complexo de Golgi
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
DC	Célula dendrítica
EGF	<i>Endothelial growth factor</i> (fator de crescimento endotelial)
EGFR	<i>Endothelial growth factor receptor</i> (receptor do fator endotelial de crescimento)
EMT	<i>Epithelial to mesenchymal transition</i> (transição epitelial mesenquimal)
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERK	Extracellular signal-regulated kinases (quinase regulada por sinal extracelular)
FIGO	<i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i>
GM-1	Gangliosídeo-1
GT	Glicosiltransferase
hrHPV	HPV de alto risco
HSIL	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
HSPG	Proteoglicano heparan sulfato
JEC	Junção escamo-colunar
LCR	<i>Long control region</i> (região longa de controle)
LIEAG	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
LIEBG	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
LM	Metástase para os linfonodos

IrHPV	HPV de baixo risco
LSIL	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i> (proteína quinase ativada por mitógeno)
MMP-2, -9	Metaloproteinase 2 e 9
ND10	Domínio nuclear 10
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NK	Células <i>natural killer</i>
PI	Envolvimento do paramétrio
PG	Prostaglandina
RE	Retículo endoplasmático
RQ	Resposta a quimiorradiação
SLD	Sobrevida livre de doença
ST	Sobrevida total
Ta	Temperatura de anelamento ótima
TGI	Trato genital inferior
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VLP	<i>Virus-like particles</i> (partículas semelhante a vírus)
ZT	Zona de transformação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	OBJETIVO	20
1.1.1	Objetivo geral	20
1.1.2	Objetivos específicos	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	ANATOMIA E HISTOLOGIA DO COLO UTERINO	22
2.2	NEOPLASIA NO TRATO GENITAL INFERIOR (TGI)	24
2.3	CÂNCER CERVICAL E DIAGNÓSTICO	26
2.3.1	Classificação do câncer cervical	28
2.3.2	Exame colposcópico	30
2.3.3	Exame citopatológico	31
2.3.4	Exame histopatológico	32
2.4	PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)	33
2.5	CICLO VIRAL E ESQUEMA DA INFECÇÃO	35
2.6	ONCOGENE E ONCOPROTEÍNA E5	37
2.7	CAVEOLINA-1	42
2.7.1	Funções da caveolina-1	46
2.7.2	Caveolina-1 e o câncer	49
2.7.3	Caveolina-1 e o HPV	54
2.7.4	Caveolina-1 e o câncer cervical	55
2.8	GANGLIOSÍDEO-1 E A BETA-1,3-GALACTOSILTRANSFERASE 4	55
2.9	COX-2	61
3	MATERIAIS E MÉTODOS	69
3.1	PACIENTES E AMOSTRAS	69
3.2	EXTRAÇÃO DE DNA E DETECÇÃO DO HPV	72
3.3	GENOTIPAGEM E <i>PRIMERS</i>	73
3.4	PURIFICAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA	74
3.5	PCR QUANTITATIVA (QPCR)	74
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	75
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1	DETECÇÃO VIRAL	75
4.2	GENOTIPAGEM	76
4.3	EXPRESSÃO DO ONCOGENE E5 DOS GENÓTIPOS 16, 31, 58	76

4.3.1	Expressão do oncogene E5 do HPV 16	76
4.3.2	Expressão do oncogene E5 do HPV 31	80
4.3.3	Expressão do E5 do HPV 58	80
4.3.4	Expressão do E5 dos genótipos estudados	81
4.4	EXPRESSÃO DA CAVEOLINA-1	82
4.5	EXPRESSÃO DA GANGLIOSÍDEO SINTASE (PAR GM1_4)	85
4.6	EXPRESSÃO DA COX-2 (PAR COX2_6)	88
4.7	CORRELAÇÃO ENTRE OS GENES ESTUDADOS	98
4.7.1	Correlação entre os oncogenes E5 dos genótipos 16, 31 e 58	100
4.7.2	E5 HPV58 X CAV-1	101
4.7.3	E5 HPV31 X GM1	101
4.7.4	CAV-1 X GM1	101
4.7.5	CAV-1 X COX-2	102
4.7.6	GM1 X COX-2	103
4.7.7	COX-2 X Oncogenes E5	103
5	CONCLUSÃO	107
	REFERÊNCIAS	108
	APÊNDICE A – PRIMERS E VALIDAÇÃO	120
	APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)	128
	ANEXO A – PUBLICAÇÕES PRODUZIDAS DURANTE O DOUTORADO	131

1 INTRODUÇÃO

O câncer cervical é considerado o quarto câncer mais comum entre as mulheres no mundo. Ainda em termos globais, foi estimado, em 2012, cerca de 530 mil novos casos e uma taxa de mortalidade de 7,5%. Verifica-se mais de 270 mil mortes todo ano, e mais de 85% dessas localizam-se em países em desenvolvimento (“Human papillomavirus and cervical cancer”, 2016) como o Brasil, onde a alta incidência desse câncer o coloca na terceira posição entre os mais frequentes. No país, este câncer constitui um problema de saúde pública grave. No ano de 2013, por exemplo, 5.430 mortes ocorreram devido a esse câncer no país. Já no ano de 2016, cerca de 16.340 mil novos casos foram relatados, sendo o quarto câncer que mais levou a óbitos (“Colo do Útero”, 2017).

O principal agente etiológico dessa doença é o papilomavírus de alto risco (hrHPV) (ZUR HAUSEN, 2009), sendo considerado causa fundamental para sua ocorrência (CHAN et al., 2012). O vírus também pode estar presente em outras regiões do organismo como a vulva, vagina, pênis, testículos, ânus, pulmão, mama, pele, cabeça e pescoço (“HPV and Cancer - National Cancer Institute”, 2015). Os genótipos 16 e 18 são os mais prevalentes, constituindo cerca de 70% dos casos de câncer cervical (“Colo do Útero”, 2017). No nordeste do país, assim como em Pernambuco, o HPV16 também é o mais prevalente, juntamente com os genótipos 58 e 31 (GURGEL et al., 2015).

No Brasil, o principal método de rastreamento do câncer cervical é o exame citológico de Papanicolau, realizado entre 21 e 65 anos de idade. Ao fazer este exame e sendo seu resultado negativo, a paciente deve retornar para o próximo atendimento em um ano. Ao ser examinada neste período e sendo o resultado novamente negativo, a mesma deverá retornar dentro de 3 anos. Por outro lado, caso seja encontrado uma lesão do tipo NIC II ou III, o exame colposcópico deverá ser realizado juntamente com o exame histopatológico da região alterada do colo uterino. Em termos de tratamento, as lesões do tipo NIC II e III deverão sofrer destruição através da excisão eletrocirúrgica ou por conização, a depender do caso. A histerectomia total é recomendada quando é encontrado microinvasão e invasão e, nesses casos, também é extraído uma biópsia para análise histopatológica, sendo a paciente submetida a uma extensa radio- e quimioterapia (MINISTÉRIO DA SAÚDE - COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA, 2016).

Não obstante a grande especificidade, o exame citológico de Papanicolau relaciona-se com importantes inconvenientes como a baixa cobertura da população; a baixa capacidade prognóstica, pois menos de 10% das lesões com atipias progridem para condições pré-malignas e carcinoma; e a necessidade da presença de uma infraestrutura cara e recurso humano especializado e bem treinado. Lesões indeterminadas como as classificadas como ASCUS e ASC-H (células escamosas atípicas de significado indeterminado e que não pode excluir HSIL, respectivamente), por exemplo, requerem repetição dos exames citológico, histopatológico e colposcópico. Nestes casos, uma frequência considerável de processo inflamatório é descrita enquanto as lesões de alto risco ou malignas representam um pequeno subgrupo.

Esse tipo de exame, portanto, apresenta limitações na capacidade diagnóstica e detecção das lesões precursoras devido à inconsistência na interpretação das atipias celulares correlacionadas a cada tipo de lesão. Isso contribui para a alta taxa de mortalidade deste câncer (“Colo do Útero”, 2017; DERCHAIN; LONGATTO FILHO; SYRJANEN, 2005). Alguns países têm adotado o rastreamento do câncer cervical por meio da detecção do HPV, entretanto, o exame apenas indica a presença ou não do vírus na lesão, não fornecendo com exatidão o estágio em que a infecção se encontra, nem o quanto poderá evoluir clinicamente (DERCHAIN; LONGATTO FILHO; SYRJANEN, 2005).

Por conseguinte, a investigação e estabelecimento do perfil de expressão de moléculas chave nos diversos estágios intraneoplásicos contribuirá para a determinação de um prognóstico seguro e eficaz. Além disso, a identificação de potenciais biomarcadores aumentaria a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico e, sendo estes dados suficientemente informativos, contribuiria para estabelecer a condição clínica fidedigna da paciente. Como consequência, condutas terapêuticas específicas seriam traçadas para a condição específica de cada indivíduo. Ademais, o programa de triagem seria aperfeiçoado, aumentando-se sua acurácia e a taxa de cobertura, melhorar-se-ia a qualidade de vida da paciente e os custos em atendimento, exames e tratamento.

Sabe-se que a oncoproteína E5 (HPV16) aumenta a expressão da caveolina-1 (Cav-1) na membrana de células cervicais (MACHADO *et al.*, 2013). Foi observado que esta proteína contribui para entrada do vírus (MACHADO *et al.*, 2013) e sido considerada uma molécula promotora da proliferação celular no câncer cervical (SUN

et al, 2012). Também foi visto ser importante para a transdução de sinais dentro da célula hospedeira, contribuindo para a evasão viral do sistema imune e para a carcinogênese (MEDINA *et al.*, 2006; ZHONG *et al.*, 2008).

O gangliosídeo-1 (GM-1), por sua vez, contribui juntamente com a cav-1 para a entrada viral. Foi observada sua detecção na superfície das células cervicais que expressam E5 em fases iniciais da infecção por hrHPV (SUPRYNOWICZ *et al.*, 2008).

Por fim, a COX-2 também sofre interferência da oncoproteína E5 (HPV16). Seu papel na carcinogênese cervical é estabelecido, embora sua associação aos diversos fatores de risco seja ainda variável. Atua desde a inflamação ao processo apoptótico e angiogênico para induzir a progressão maligna cervical (DE FREITAS *et al.*, 2017).

Com base no exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar, *in vivo*, o perfil de expressão dos genes cav-1, GM1 e COX-2 na carcinogênese cervical e sua correlação com o perfil de expressão do oncogene viral E5.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo geral

Investigar o perfil de expressão do oncogene E5 em diferentes genótipos de HPV, e dos genes alvos do hospedeiro como a caveolina-1, o gangliosídeo-1 e COX-2 em biópsias de lesões cervicais.

1.1.2 Objetivos específicos

- i. Investigar os genótipos de HPV presentes em amostras cervicais coletadas em pacientes atendidas em hospitais públicos da cidade do Recife;
- ii. Desenhar e validar *primers* para utilização na qPCR;
- iii. Analisar o perfil de expressão dos oncogenes dos diferentes genótipos de HPV;
- iv. Analisar o perfil de expressão dos genes caveolina-1, gangliosídeo-1 e COX-2 nas amostras cervicais;

- v. Correlacionar o perfil de expressão dos genes alvos de E5 com o perfil de expressão dos oncogenes E5 dos diferentes genótipos virais;
- vi. Identificar, a partir da correlação com o genótipo viral e expressão dos genes alvos, possíveis biomarcadores dos diferentes estágios de lesão cervical.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANATOMIA E HISTOLOGIA DO COLO UTERINO

O colo uterino (figura 1) é a porção fibromuscular inferior do útero, de formato cilíndrico ou cônico, de comprimento em torno de 3 a 4 cm e diâmetro de 2,5 cm. É constituído por duas porções, uma inferior ou vaginal, e outra supravaginal, que se conecta com a primeira por meio do orifício cervical externo. Por sua vez, a porção supravaginal conecta-se ao corpo do útero através do orifício cervical interno. O canal delimitado pelos orifícios cervicais externo e interno é denominado de canal endocervical e liga a cavidade uterina à vaginal. A região situada distalmente ao orifício cervical externo é denominada de ectocérvice enquanto a porção mais proximal de endocérvice. Já todo o volume da parte vaginal (regiões anterior, posterior e laterais) que abriga o colo uterino é denominado de fundo de saco vaginal (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004).

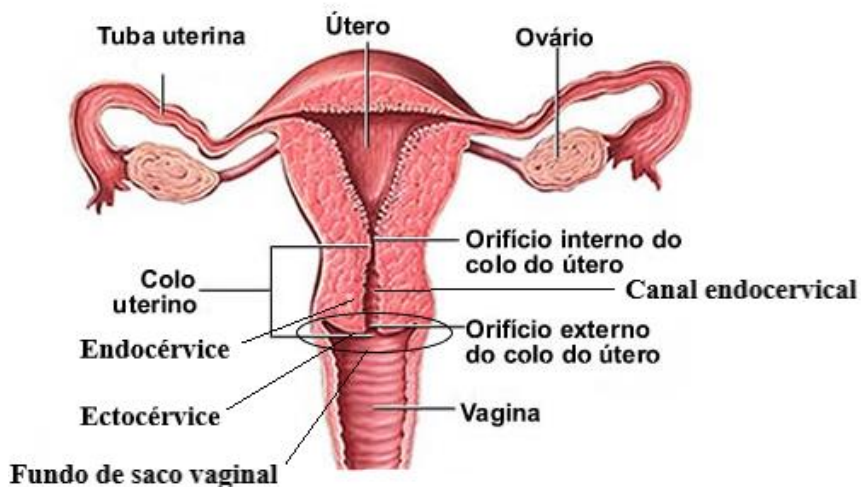


Figura 1. Representação do colo uterino.

Fonte: (PEREIRA, 2017) modificado.

O colo uterino é formado por dois tipos de tecidos que se encontram na chamada junção escamo-colunar (JEC): o tecido escamoso estratificado não-queratinizado (figura 2) e o tecido colunar (ou glandular) simples. O primeiro é responsável por recobrir a ectocérvice e a vagina e possui quatro camadas, enquanto o segundo encobre a endocérvice e é formado por uma camada simples de células

altas e núcleos de coloração escura e próximos à membrana basal (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004; SILVA NETO, 2012).

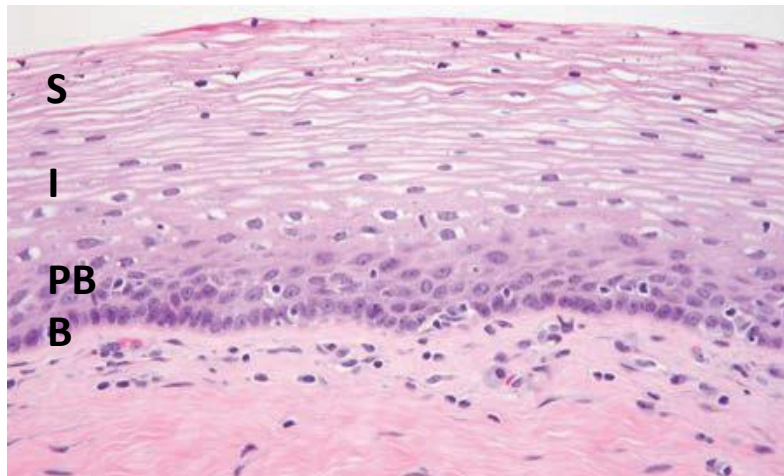


Figura 2. Epitélio escamoso estratificado não queratinizado. As quatro camadas que compõem esse tecido caracterizam-se por graus de diferenciação/maturação decrescentes a medida que se situam mais internamente. São as camadas formadas pelas células superficiais (S) – mais maduras e com maior quantidade de glicogênio –, intermediárias (I), parabasais (PB) e basais (B) – mais imaturas e com maior atividade mitótica –, logo acima da membrana basal. Abaixo está o estroma. Fonte: (HOFFMAN et al., 2014)

O tecido colunar ainda recobre uma parte variável da ectocérvice. É nesta região, chamada de zona de transformação (figura 3), onde há a transformação em tecido escamoso (processo chamado de metaplasia escamosa) (HOFFMAN et al., 2014; SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004).

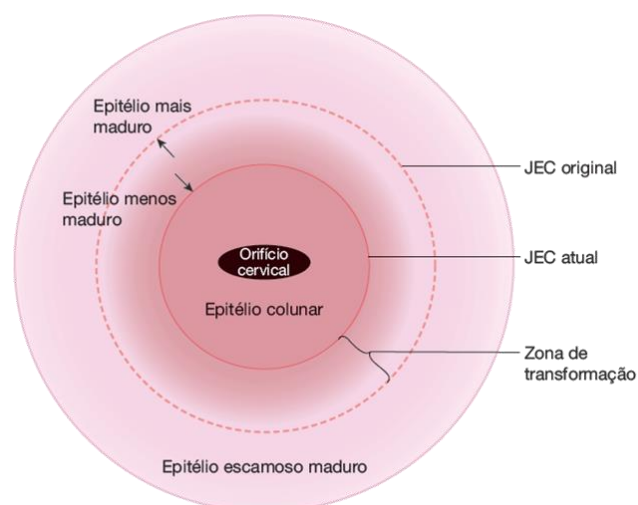


Figura 3. Zona de transformação e disposição histológica do colo uterino. O colo uterino é formado pelo epitélio colunar, que reveste a endocérvice, e que gera o epitélio escamoso. Entre eles situa-se a região metaplásica, a zona de transformação, delimitada pelas JECs antiga e nova. Esta região é onde ocorre quase todas as neoplasias cervicais. Fonte: (HOFFMAN et al., 2014)

2.2 NEOPLASIA NO TRATO GENITAL INFERIOR (TGI)

A neoplasia intraepitelial refere-se as lesões encontradas no tecido epitelial escamoso estratificado do colo uterino. São causadas principalmente pela infecção pelo HPV, além de possuírem um forte contexto imunológico. Outras características são cofatores para a sua ocorrência, como a idade, comportamentos sexuais (início precoce, multiplicidade de parceiros etc), baixo nível socioeconômico, tabagismo (mais evidente para câncer no epitélio escamoso do que no colunar), uso de contraceptivos, paridade (não muito claro) e a falta de exame de rastreamento (estima-se que metade das mulheres diagnosticadas jamais tenham realizado exame de rastreamento) (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004).

As lesões são identificadas pelo exame colposcópico e classificadas de acordo com a análise histológica das biópsias extraídas dos locais suspeitos. Compreende lesões que apresentam desde displasia¹ leves com poucas alterações citoplasmáticas e nucleares, até displasia severas e carcinoma *in situ*, o que não inclui invasão da membrana basal. Quando isto ocorre, a lesão é chamada de invasão, o qual pode ter origem escamosa ou glandular, ou seja, o carcinoma escamoso ou adenocarcinoma respectivamente. O adenocarcinoma ainda pode ser classificado em adenocarcinoma *in situ* (AIS) ou somente adenocarcinoma (HOFFMAN et al., 2014). Em relação ao AIS, pode estar associado à NIC (epitélio escamoso) em um a dois terços dos casos (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004).

A classificação das lesões neoplásicas intraepiteliais decorre da gravidade da displasia, considerando a proporção do epitélio acometido a partir da membrana basal até a superfície, e ainda da capacidade desta lesão regredir ou progredir para carcinoma (tabela 1). Desse modo, em 1968 foi introduzido o termo NIC (neoplasia intraepitelial cervical) que, a partir dos parâmetros citados classificava as lesões em três graus: NIC I, II e III, sendo o estágio I considerado displasia leve, o II moderada, e o III em displasia grave e carcinoma *in situ* (CIS) (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004).

1. O termo displasia foi criado no final dos anos 1950 para denominar grau de atipia epitelial cervical intermediário entre o epitélio normal e o carcinoma *in situ* (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004).

2. Coilocitos são células atípicas com uma cavitação ou auréola perinuclear no citoplasma indicativas de infecção pelo HPV (SILVA NETO, 2012).

Tabela 1. Expectativa de regressão/progressão de lesões pré-neoplásicas

	REGRESSÃO	PERSISTÊNCIA	PROGRESSÃO PARA CIS	PROGRESSÃO PARA INVASÃO
NIC I	57%	32%	11%	1%
NIC II	43%	35%	22%	5%
NIC III	32%	<56%	-	>12%

Fonte: (HOFFMAN et al., 2014)

Outra terminologia frequentemente utilizada foi introduzida em 1990, e passou a incluir as atipias provocadas pelo HPV, a coilocitose², classificando as lesões em lesões intraepiteliais escamosas de baixo (LIEBG) ou alto grau (LIEAG). O primeiro caso inclui alterações decorrentes da infecção pelo HPV ou próprias do estágio NIC I. O segundo inclui alterações próprias dos estágios NIC II e NIC III, sendo as lesões que apresentam maior probabilidade de progredirem para carcinoma (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004).

Por fim, em 1991, reunindo recomendações de dois simpósios realizados nos anos de 1988 e 1991, criou-se o sistema Bethesda para descrição dos resultados da citologia cervical, os quais também se utiliza para os laudos histopatológicos. Surgiu assim, os termos LSIL e HSIL, os quais significam lesão intraepitelial escamosa de baixo e alto grau, respectivamente. O termo “lesão” passa a ser utilizado, então, como qualquer alteração morfológica, não necessariamente indicativa de neoplasia. Em 2001 o sistema Bethesda foi reavaliado e revisado (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004).

Ainda existem os termos ASC-US e ASC-H, os quais significam células escamosas atípicas (ASC) de significado indeterminado e que não pode excluir HSIL, respectivamente (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004). Essas lesões têm caráter indefinido e, portanto, oferecem uma grande desvantagem aos profissionais que cuidam daquela paciente, pois não se desconhece a condição clínica da paciente e, portanto, desconhece-se se a paciente está sendo acometida por alguma condição patológica grave ou de qualquer outro prognóstico.

2.3 CÂNCER CERVICAL E DIAGNÓSTICO

O câncer cervical ou carcinoma cervical invasivo, decorre da manutenção e posterior progressão das lesões pré-neoplásicas, isto é, quando estas lesões adquirem a capacidade invasiva. Estas lesões podem ser classificadas em dois tipos histológicos, o carcinoma de células escamosas e os adenocarcinomas, sendo o primeiro mais comum³ (75% dos casos). Estes dois subtipos tornam o câncer cervical o tumor ginecológico mais comum e, diferentemente dos outros, ocorre em uma faixa de idade mais jovem (HOFFMAN et al., 2014).

Para ocorrência do câncer cervical, é necessário a existência de fatores de risco. Como descrito anteriormente, as atividades do HPV e sua ação sobre a resposta imune são os principais agentes que possibilitam a geração das lesões pré-neoplásicas, e o mesmo acontece para a formação do carcinoma invasivo (BARROS et al., 2018a, 2018b). Em geral o sistema imune é capaz de destruir as células infectadas e eliminar o vírus. Contudo, em uma pequena porcentagem (cerca de 10%) de mulheres a infecção progride para o câncer (GONÇALVES; DONADI, 2004).

Os oncogenes virais são os maiores responsáveis pelas interferências provocadas no sistema imune (quadro 1). O E5, por exemplo, é capaz de reduzir o processamento e apresentação antígenos, alternar a produção de citocinas para o perfil Th2 (*T helper*), induzir a expressão da caveolina-1 e gangliosídeo-1 na membrana plasmática, estimular a expressão gênica da COX-2 e, indiretamente aumentar a atividade das células T regulatórias, neutrófilos e macrófagos M2 (BARROS et al., 2018a, 2018b).

3. Embora o carcinoma de células escamosas seja bem mais frequente que os adenocarcinomas, esta relação vem diminuindo ao passar dos anos. Como o primeiro é mais facilmente detectável pelos métodos de rastreamento atuais cada vez mais comuns, os casos de adenocarcinomas vêm aumentando sua frequência em relação ao primeiro (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004).

Quadro 1. Efeitos sobre a resposta imune causados pelos oncogenes virais		
ONCOPROTEÍNA	EFEITO	MECANISMO DE AÇÃO
E5	Redução da expressão e do transporte para a superfície celular do	E5 reduz tanto a expressão gênica quanto o transporte para a membrana celular das duas classes de MHC. Esta oncoproteína liga-se a cadeia pesada do MHC I e induz a alcalinização do endossomo, complexo de Golgi (CG) e retículo endoplasmático (RE) reduzindo, portanto, sua presença na superfície da célula
E7	MHC classes I e II	Provoca <i>downregulation</i> de moléculas envolvidas no processamento de antígenos como TAP-1 e -2, LMP-2 e -7 e de componentes do MHC I
E6	Reduzem a atividade e quimioatração das APCs e células NK (<i>natural killer</i>)	Reduzem a atividade das células dendríticas (DC) por diminuírem a expressão de CD40, CD80 e CD86 (coativadores das DCs) e aumentarem a expressão de CTLA-4, PD-1 e PD-L1 (inibidores das DCs)
		Reduz a expressão de E-caderina, diminuindo o recrutamento das células de Langerhans no local da infecção
E7		Reduz o recrutamento das APCs por diminuírem a expressão de moléculas de adesão como MCP-1, IL-8, CCL2 e CCL20
-		Redução da expressão de receptores de ativação (p.ex. NKG2D) das células NK
E7	Modulam a expressão de	Reduz a expressão de TLR9 por bloqueio da via do fator de transcrição NF-κB
-	<i>Toll-like receptors</i> (TLRs) Interferências em vias de	TLR4 é super expresso em linhagens celulares de câncer cervical e em amostras pré- e neoplásicas. Outros TLRs como o 3, 7 e 8 também foram vistos super expressos em biópsias de pacientes com câncer cervical

E5	transdução de sinal	E5 interfere nas vias de transdução de sinal dos IFNs e TGF-β inibindo suas ações imunoprotetoras e estimulando suas ações imunoinibitórias
E6 e E7		Inibem a via do NF-κB por bloquearem seu deslocamento para o núcleo além de diminuir sua capacidade transcricional por aumentar a expressão de IFDR1 e causarem a proteólise de IL-1β
E5	Modulação de moléculas e do perfil de citocinas	Aumenta a expressão do EGF-R, cav-1 e GM1 na superfície celular
-		Redução dos níveis de TNF-α, IFN I, IFN-γ, IL-8, IL-12, MIP-1α, CXCL12 e aumento de IL-4, IL-9, IL-10, IL-15 e TGF-β
Referência: (BARROS et al., 2018a, 2018b; DE FREITAS et al., 2017)		

2.3.1 Classificação do câncer cervical

O câncer cervical é classificado de acordo com a gravidade apresentada, e isso depende da sua capacidade de invasão. Portanto, são considerados vários atributos, como a invasão estromal, do paramétrio, da parede pélvica etc. A tabela 2 a seguir mostra a classificação dos vários estágios do câncer cervical levando em consideração essas características, sendo denominada de sistema FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*) de estadiamento do câncer cervical.

Tabela 2. Classificação do estadiamento do câncer cervical pelo sistema FIGO

FIGO	ACHADOS PATOLÓGICOS
I	Carcinoma cervical confinado no colo uterino (deve ser desconsiderado se há extensão para o corpo uterino). O diagnóstico

- dos estádios IA1 e IA2 deve ser baseado no exame microscópico do tecido excisado (preferencialmente um cone que inclua toda a lesão).
- IA Carcinoma invasivo diagnosticado apenas por microscopia; invasão do estroma de no máximo 5 mm de profundidade e diâmetro de até 7 mm. O envolvimento do espaço vascular, venoso ou linfático, não afeta a classificação.
- IA1 Invasão medida do estroma de até 3 mm de profundidade e 7mm de diâmetro
- IA2 Invasão medida do estroma entre 3 mm e 5 mm de profundidade e até 7 mm de diâmetro
- IB Lesões clínicas limitadas ao colo uterino ou lesões pré-clínicas maiores que no estágio IA. Todas as lesões macroscópicas, mesmo com invasão superficial, são consideradas neoplasias do estágio IB.
- IB1 Lesões clínicas de até 4 cm
- IB2 Lesões clínicas maiores que 4 cm
- II Refere-se ao carcinoma que se estende além do colo uterino, mas não invade a parede pélvica. Atinge a vagina até o terço inferior.
- IIA Não há comprometimento evidente do paramétrio. A invasão ocorre até os dois terços superiores da vagina
- IIA1 Lesão clinicamente visível com até 4 cm na dimensão de maior valor
- IIA2 Lesão clinicamente visível com mais de 4 cm na dimensão de maior valor
- IIB Comprometimento evidente do paramétrio, mas não à parede pélvica lateral
- III Carcinoma que atinge a parede pélvica lateral e/ou terço inferior da vagina. Causa hidronefrose ou rim não funcionante.
- IIIA Há invasão ao terço inferior da vagina, mas não à parede pélvica
- IIIB Estende-se a parede pélvica, hidronefrose ou rim não funcionante
- IV Carcinoma estende-se para além da pelve verdadeira ou invadiu clinicamente a mucosa da bexiga e/ou o reto
- IVA Disseminação do tumor para órgãos pélvicos adjacentes
- IVB Disseminação para órgãos a distância

Referência: (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004)

2.3.2 Exame colposcópico

Criado pelo médico alemão Hans Hinselmann em 1925 (SILVA NETO, 2012), o exame colposcópico é um procedimento ambulatorial padrão ouro para investigação clínica de anormalidades cervicais. Feito por meio de um aparelho chamado de colposcópio⁴, é indicado clinicamente quando existem lesões visíveis no TGI (independente da suspeita colposcópica), sangramento, exposição intrauterina ao dietilestilbestrol ou quando a citologia apresenta alguma anormalidade (HOFFMAN et al., 2014).

Além da procura por lesões pré-neoplásicas, a colposcopia também é útil para monitorar as pacientes com histórico atual ou prévio de neoplasia no TGI e orientar a biópsia de lesões (por meio da utilização das soluções de ácido acético a 5% e lugol). Sua realização permite a visualização ampliada dos tecidos do trato genital inferior por cerca de 6 a 40 vezes com o objetivo de buscar e identificar atipias situadas na vulva, vagina ou colo uterino, principalmente a porção constituída pela ectocérvice. A porção endocervical também pode ser vista, mas somente por meio do uso de um espéculo endocervical (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004).

Apesar da grande importância da realização da colposcopia e dos benefícios que invariavelmente traz as pacientes, a sensibilidade do exame é em torno de 70% para detecção de neoplasia de alto grau. Por conta disso, o analista deve procurar realizá-lo do modo mais satisfatório possível, o que inclui a visualização adequada de toda JEC e dos limites superiores das lesões encontradas, pois a gravidade da doença tende a localizar-se no limite superior da zona de transição. A inspeção apropriada de toda lesão é chave para garantia de um diagnóstico fidedigno ao final de todas as etapas de avaliação da paciente, o que aumenta a sensibilidade no exame. A criação de novas metodologias de investigação mais eficazes, no entanto, se faz necessária, como a promissora técnica de hiperespectroscopia multimodal (HOFFMAN et al., 2014).

4. É formado por três partes: o sistema de lentes, o de iluminação e o estrutural. O microscópio binocular situa-se na “cabeça” que se articula em uma haste vertical presa geralmente à mesa de exame por um braço móvel. À cabeça pode-se fixar câmeras fotográficas ou outros aparelhos de imagem (SILVA NETO, 2012).

2.3.3 Exame citopatológico

O exame citológico é o procedimento padrão de rastreamento do câncer de colo uterino e apresenta especificidade em torno de 98%. Expandido pelo médico grego George Nicolas Papanicolaou, o método, que também é conhecido pelo o seu nome, tornou-se essencial para identificação inicial das lesões pré-neoplásicas em todo o mundo, levando a uma ampla redução da incidência e mortalidade (60% e 70% respectivamente) do câncer cervical na população feminina global (HOFFMAN et al., 2014).

O exame Papanicolaou apresenta sensibilidade relativamente alta, que é compensada pela periodicidade do exame. Embora a aderência desse procedimento seja de fundamental importância para a diminuição das taxas de incidência e mortalidade, estima-se que entre 30% e 40% dos diagnósticos do câncer cervical sejam em mulheres adequadamente rastreadas. Tal fato decorre, dentre outros motivos, de erros de amostragem e de interpretação do analista.

Sendo assim, métodos diagnósticos adicionais vêm sendo aderidos aos programas de rastreamento com intuito de aumentar a eficiência de identificação e porcentagem de cura (HOFFMAN et al., 2014).

Recomenda-se a primeira realização do exame após 3 anos da primeira relação sexual ou não depois de 21 anos para as que nunca realizaram. O exame deve ser repetido a cada ano por 2 anos, e a cada 3 anos caso os resultados anteriores tenham sido negativos. Mulheres com mais de 70 anos que apresentam os três últimos resultados negativos nos últimos 10 anos não precisam mais realizar o exame (SILVA NETO, 2012).

Sendo um exame de rastreamento, ele é útil apenas para direcionar a próxima etapa na avaliação da paciente, não sendo definitivo para o diagnóstico. Dessa maneira, pode-se apenas suspeitar o estágio de NIC que se encontra a lesão, sendo o diagnóstico final somente estabelecido a partir do exame histopatológico (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004).

2.3.4 Exame histopatológico

O exame histológico é a ferramenta útil para diagnosticar a presença e, principalmente, determinar o estágio da neoplasia da lesão identificada e pré-analisada pela colposcopia e/ou citologia. Neste exame são avaliados o grau de diferenciação, maturação, estratificação e anomalias celulares (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004). Para isso, diversos atributos celulares são avaliados, como a relação núcleo/citoplasma (N/C), nucléolo etc (quadro 2).

Quadro 2. Padrões celulares de cada estágio pré-neoplásico e carcinoma				
	NIC I	NIC II	NIC III	Carcinoma
Razão N/C	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada
Anomalias citoplasmáticas	Translúcido, margens distintas	Abundante, basofilia	Escasso, células ovais, cianófilo	Escasso, cianófilo
Anomalias nucleares⁵	Mínimas. Bi- ou multinucleação	Cariomegalia (3x núcleo da célula intermediária), forma variada		Cariomegalia, pleomórfico
Nucléolo	Raro ou ausente	Eventuais e cromocentros		Presente
Cromatina	Homogênea, hipercromática	Heterogênea, grânulos grosseiros, eventual paracromatina, hipercromática		Grosseira, irregular, hipercromática
Grau de indiferenciação	Restrita ao terço inferior do epitélio	½ a ⅔ inferior do epitélio	Todo epitélio	Todo epitélio
Frequência de mitose	Baixa	½ inferior do epitélio	Todo epitélio	Todo epitélio
Referência: (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004; SILVA NETO, 2012)				

5. As anomalias nucleares incluem a irregularidade da membrana nuclear, volume do nucléolo e apresenta multinucleação.

2.4 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Os papilomavírus compreendem uma família de vírus não envelopados com mais de 200 vírus sequenciados, cujo genoma é constituído por DNA dupla-fita com cerca de 8 kb (figura 4). Este inclui a região LCR (*long control region*), que abrange elementos reguladores de expressão gênica, e os genes denominados de expressão precoce (*early*) – E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (sendo estes três últimos oncogenes) – e tardia (*late*) – L1 e L2. Algumas regiões gênicas são bastante conservadas, como as que abrangem os genes E1, E2, L1 e L2, enquanto outras apresentam um grau de variação acentuada, como os oncogenes (E5, E6 e E7) e E4. Regiões promotoras e de *splicing* também são bastante heterogêneas entre os tipos virais, o que determina as diferentes propriedades de tropismo e de patogenicidade (DOORBAR et al., 2016).

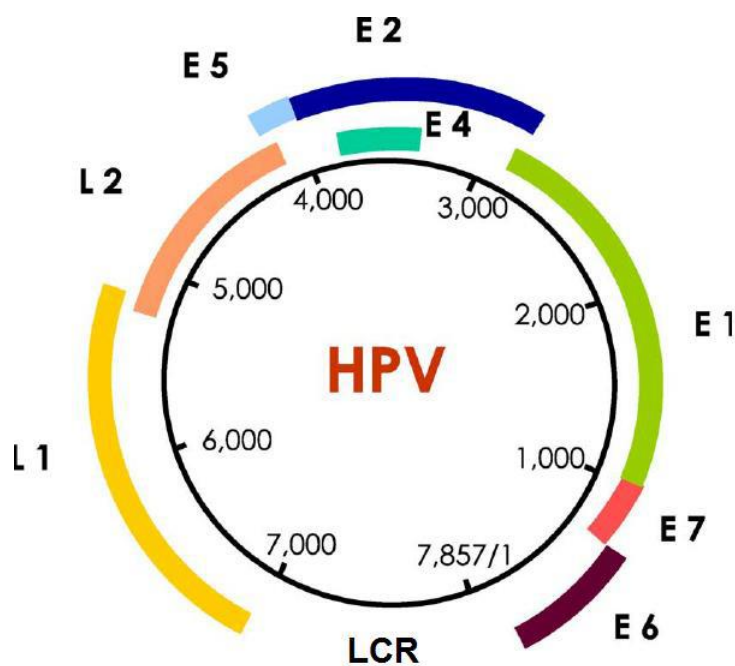


Figura 4. Esquema do genoma viral. Nota-se que algumas regiões são compartilhadas por mais de um gene sendo, portanto, estes genes codificados por contribuição do *splicing*.
Fonte: (CORDEIRO, 2015)

O HPV apresenta estrutura icosaédrica, com 360 moléculas de L1 organizadas em 72 capsômeros (5 moléculas de L1 em cada capsômero). Esses interagem entre si por meio da cauda C-terminal da proteína L1 que realizam pontes dissulfeto. A proteína L2 também contribui com a L1 para formação da estrutura do HPV. Embora a L2 não esteja completamente exposta na superfície viral, essa proteína torna-se disponível para ligação a matriz extracelular durante a infecção,

sendo clivada pela furina. Isso resulta em alterações conformacionais que permitem a interação do vírus com células epiteliais e sua posterior internalização nestas células (DOORBAR et al., 2016; MCBRIDE, 2008).

Os genótipos virais que infectam humanos são divididos em cinco gêneros, o alfa, beta, gama, mu e nu. Esta divisão ocorre por análise genética, sendo necessário que ocorram diferenças de no mínimo 10% na sequência do gene L1 para que dois determinados genótipos sejam considerados pertencentes de gêneros diferentes. Os principais são o alfa e o beta, que juntos constituem cerca de 90% dos HPVs caracterizados (DOORBAR et al., 2016).

O gênero alfa (figura 5) abrange os principais genótipos causadores do câncer cervical no mundo. O genótipo 16, por exemplo, é responsável por mais de 50% dos casos e cerca de 90% são causados pelos genótipos 16, 18, 31, 33 e 45 (SILVA NETO, 2012).

No Brasil, os genótipos mais frequentes são o 16, 31 e 58 (RAIOL et al., 2009). Juntos, eles contribuem para tornar o câncer cervical o terceiro mais comum – cerca de 16.340 novos casos foram reportados em 2016 – e a quarta causa de óbitos na população feminina, constituindo um sério problema de saúde (“Colo do Útero”, 2017).

Na região nordeste, a prevalência do câncer cervical é ainda maior, sendo o segundo tipo de tumor mais comum entre mulheres (FACINA, 2011). Quanto a frequência dos genótipos, segue a mesma prevalência do país, sendo o 16 o mais comum seguido do 58 e 31 (GURGEL et al., 2015). Este padrão de frequência repete-se quando considerado somente as lesões em NIC III (FERNANDES et al., 2013).

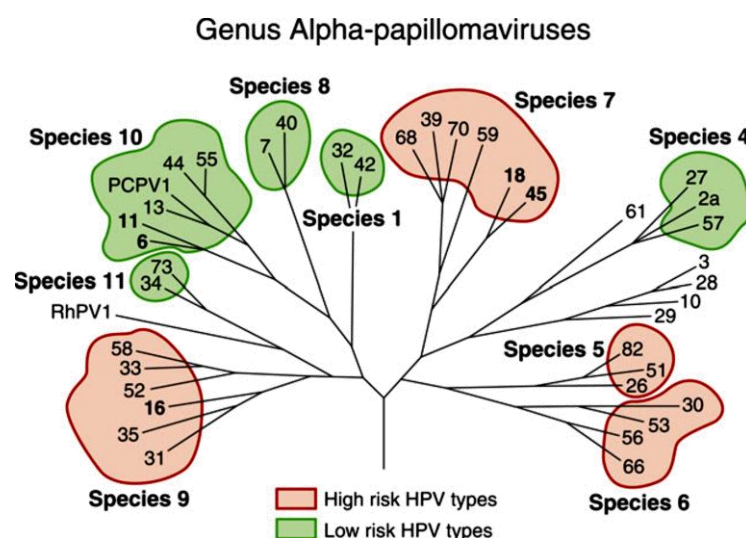


Figura 5. Espécies virais segundo o gênero alfa. Fonte: (SYRJÄNEN, 2018)

2.5 CICLO VIRAL E ESQUEMA DA INFECÇÃO

O ciclo viral do HPV (figura 6) segue o processo de amadurecimento e morte celular natural do tecido cervical não infectado, ou seja, obedece ao sentido basal-apical. Isto se deve a fim de garantir a eficiência da infecção, pois, desta maneira, o vírus é reconhecido mais dificilmente pelo sistema imune do hospedeiro e, portanto, não é eliminado, permitindo a possibilidade de ocorrência do tumor (ARREGUI, 2012).

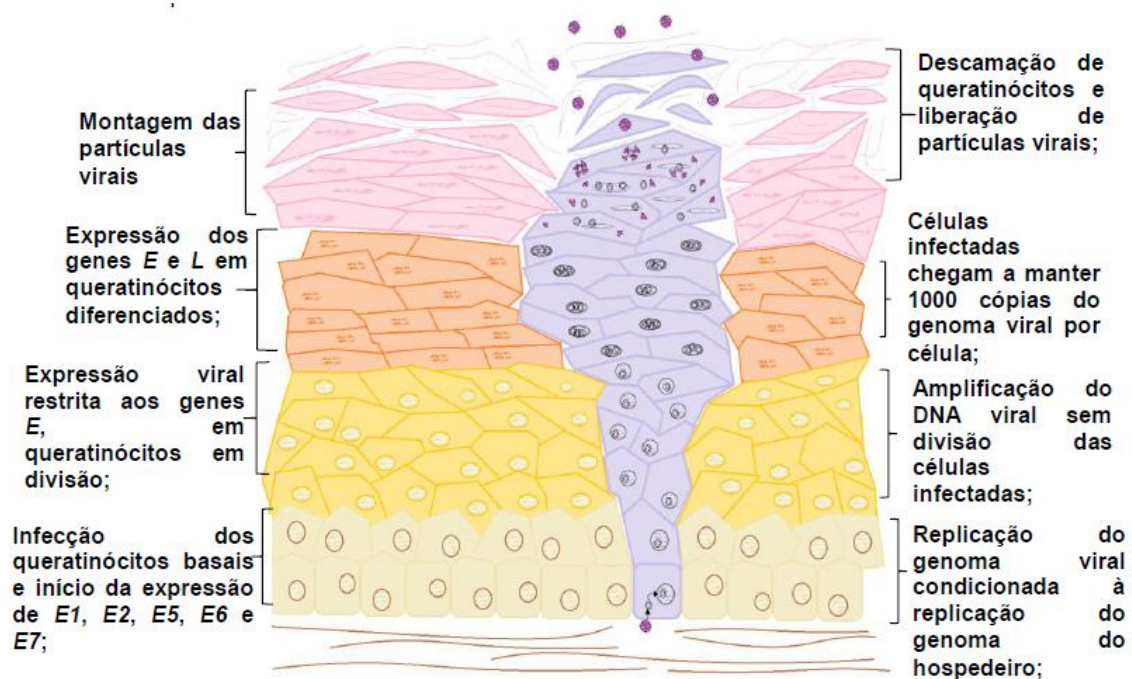


Figura 6. Esquema da infecção pelo HPV através do tecido cervical.

Fonte: (CORDEIRO, 2015)

Sabe-se que o ciclo viral difere entre os papilomavírus humano de baixo risco (lrHPV) e de alto risco (hrHPV), embora algumas etapas sejam comuns. De modo geral, o HPV atinge o interior do organismo por meio da presença de microinjúrias no tecido cervical devido ao ato sexual. Este evento permite que o vírus se ligue a uma molécula não-relacionada ao heparan-sulfato, a laminina-332 (ou laminina-5), no caso dos HPVs de importância clínica 16, 6 e 11, presente na membrana basal. Este polissacarídeo pode agir como um receptor temporário na matriz extracelular, permitindo que o HPV, ao se ligar a ele, seja direcionado às células-alvo da infecção. Esta ligação varia entre os diversos genótipos virais, sendo importante para definir o sítio anatômico da infecção espécie-específica, impedir interações não-específicas

com as células das camadas superficiais, além de atrair o vírus para a superfície das células escamosas basais (SAPP; BIENKOWSKA-HABA, 2009).

Uma vez presente na membrana basal, o papilomavírus interage com outras moléculas localizadas na superfície das células escamosas que funcionam como receptores, sendo o primeiro da sequência de interações o proteoglicano heparan sulfato (HSPG) (SAPP; BIENKOWSKA-HABA, 2009), embora que para alguns genótipos, como o 31, o HSPG não seja necessário (PATTERSON; SMITH; OZBUN, 2005). Este proteoglicano liga-se à proteína L1 viral, o que ocasiona uma nova conformação estequiométrica tanto da proteína L1 quanto da L2. Isto é suficiente para permitir a ligação da proteína chaperona ciclofilina B, uma isomerase da superfície celular que expõe o trecho N-terminal da proteína L2, que, por sua vez, é clivada pela furina convertase. Todas estas mudanças conformacionais possibilita a ligação das proteínas capsidiais a um receptor secundário (não-HSPG), o qual não se conhece ao certo sua identificação, e que está envolvida na entrada do complexo viral na célula-alvo por vias clatrina-dependente ou -independente e na perda de seu revestimento protéico (SAPP; BIENKOWSKA-HABA, 2009). Os prováveis candidatos são a $\alpha 6$ -integrina, um receptor de fator de crescimento, a tetraspanina e a anexina A2 (SCHILLER; DAY; KINES, 2010).

Posteriormente a internalização e perda do revestimento protéico, L1 dissocia-se de L2 que se complexa com o genoma viral e o transporta para o interior do domínio nuclear 10 (ND10) dentro do núcleo da célula hospedeira (DAY et al., 1998). É nesta região, nas células da camada basal, que o HPV inicia seu processo de replicação e seu programa de expressão na forma episomal (DAY et al., 2004), sendo os RNAs gerados produtos do *splicing* alternativo. Os primeiros produtos proteicos gerados são o E1 e o E2, os quais garantem a replicação viral da forma episomal de forma independente do ciclo de vida da célula hospedeira. Durante esta fase, é criado um pool de células infectadas que possuem em torno de 10 a 50 cópias do genoma viral por célula, que são úteis como reservatório de vírus. Nenhuma partícula viral é eliminada, o que torna muito improvável o reconhecimento da presença viral pelo sistema imune do hospedeiro (MCBRIDE, 2008).

A medida que a infecção atinge a camada parabasal, é iniciada a expressão dos genes E4 e E7 juntamente com a expressão dos genes E1 e E2. E4 e E7 induzem a amplificação do genoma por meio da interrupção do ciclo celular da célula hospedeira em estágios específicos, o que significa que eles podem prevenir a

diferenciação das células infectadas e restabelecer o ciclo de vida normal nas camadas seguintes e de localização posterior. Nas camadas intermediárias e superficiais, a expressão de E5 e E6 junta-se a de E7, o que garante a manutenção da desregulação do ciclo e diferenciação celulares. Isto contribui para a carcinogênese, pois provoca o aumento da proliferação celular e surgimento de novas mutações pró-tumorigênicas (DOORBAR, 2005).

Uma vez que as células infectadas atingem as camadas superficiais do epitélio escamoso estratificado, a produção de virions intensifica-se. Com este objetivo, L2 localiza-se nos domínios ND10 e forma um complexo com outras proteínas recrutadas como L1, E2 (DAY et al., 1998) e chaperonas como a NPM1/B23, uma fosfoproteína nucleolar cuja ausência gera instabilidade na formação do capsídeo (DAY et al., 2015).

L1, então, auto-organiza-se em partículas semelhantes a vírus (*virus-like particles* - VLPs), enquanto L2 empacota o genoma viral dentro do capsídeo. Por fim, estas duas proteínas interagem entre si por meio de ligações cruzadas intermoleculares de dissulfeto para formar um capsídeo icosaédrico não envelopado com 72 capsômeros e de diâmetro entre 55-60nm, assistido por chaperonas. Desta maneira, a produção e liberação de vírus atingem níveis máximos, aproveitando-se do fato de que as células superficiais estão encerrando seu ciclo natural de vida e sofrem apoptose. Esta ocasião é conveniente, pois garante que o sistema imune permaneça sem reconhecer a presença do vírus no organismo, já que o acesso das células imunes é limitado nas camadas superficiais (GRABOWSKA; RIEMER, 2012). Todos os componentes apresentados são essenciais para a infectividade do papilomavírus e podem ser usados como alvos terapêuticos a fim de diminuir a taxa de infecção ou ainda de prevenir a sua ocorrência.

2.6 ONCOGENE E ONCOPROTEÍNA E5

O oncogene E5 localiza-se no final 3' da região precoce (*early region*) do genoma viral. Sua expressão provém de RNAm que sofre *splicing*, pois sua sequência codificadora inicia-se na região gênica referente a E2 (como visto na figura 4). Gera uma proteína de 83 aa, altamente hidrofóbica, com localização na membrana plasmática e de baixos níveis de expressão. Contudo, nem todo HPV é capaz de

codificar esta oncoproteína, sendo mais comumente relacionada com os hrHPVs (VENUTI et al., 2011).

E5 é uma das oncoproteínas do HPV cujo reconhecimento de sua importância na carcinogênese cervical tem crescido bastante nos últimos anos, embora seja importante ressaltar que sua capacidade oncogênica altera-se de acordo com o genótipo viral. Versões polimórficas produzidas pelos lrHPVs (p.ex. E5 β , γ e δ) apresentam-se incompetentes em termos carcinogênicos comparativamente as variantes sintetizadas pelas hrHPVs (p.ex. E5 α) (DE FREITAS et al., 2017). Geralmente E5 está associada aos estágios iniciais da carcinogênese cervical, por ser perdida durante a integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira. No entanto, vários estudos vêm demonstrando a presença e níveis aumentados de sua expressão também em estágios mais avançados da progressão maligna (CHANG et al., 2001) e em linhagens de câncer cervical (BARBARESI et al., 2010).

A oncoproteína E5 mais bem estudada é a pertencente ao HPV16, sendo as sintetizadas pelos outros genótipos raramente avaliados. Aos poucos, diversos efeitos pró-carcinogênicos centrais para a progressão maligna dessa oncoproteína foram sendo revelados (alguns são vistos na figura 7). O primeiro deles reflete-se em sua capacidade de potencializar as atividades de transformação de E6 e E7, pois agindo sozinha tem demonstrado baixa atividade carcinogênica (VENUTI et al., 2011). Juntamente com E6, por exemplo, E5 induz a formação de coilócitos (alterações celulares provocadas pela ação do HPV e que podem ser identificadas na citologia e histologia). Além disso, o E5 é capaz de induzir a expressão gênica de E6 e E7, por aumentar a expressão de c-jun e c-fos, contribuir para a imunoevasão induzida por E6 e E7, entre outros. É visto, por exemplo, que camundongos transgênicos que expressam E6 e E7 no epitélio basal desenvolvem menos tumores que aqueles que expressam além desses dois oncogenes o oncogene E5 (VENUTI et al., 2011). Outros efeitos de E5 são exercidos sobre:

i. a proliferação celular: E5 ativa o EGF-R, endotelina-1 e inibe p21 e p27 em queratinócitos e fibroblastos (DIMAIO; PETTI, 2013);

ii. o tráfego vesicular e transdução de sinal: E5 altera a constituição lipídica dos *lipid rafts* por meio da indução da expressão da caveolina-1 e gangliosídeo-1 na membrana plasmática (VENUTI et al., 2011);

iii. as vias de sinalização intracelular: E5 é capaz de estimular as vias da ERK1/2, p38, MAPK, PI3K e fosfolipase C γ 1 (DIMAIO; PETTI, 2013);

Pode-se observar, então, que a abrangência de efeitos da oncoproteína E5 é ampla, sendo a grande maioria das atividades demonstradas provindas de estudos sobre o genótipo 16. Suas ações incluem desde efeitos sobre a mitogênese até a modulação da resposta imune do hospedeiro. Além disso, é observado também que a oncoproteína E5 interfere na regulação do ciclo celular, apoptose, regulação de fatores de transcrição (DE FREITAS et al., 2017; DIMAIO; PETTI, 2013; VENUTI et al., 2011) e na transdução de sinal intracelular por meio de seus efeitos sobre a caveolina-1 e gangliosídeo-1 (SUPRYNOWICZ et al., 2010). Um resumo dos efeitos da oncoproteína E5 (HPV16) é vista na tabela 3.

Tabela 3. Influência da oncoproteína E5 (HPV16) sobre o organismo hospedeiro

ATIVIDADE DE E5	MECANISMO
Inibição do transporte do MHC I para a superfície celular, redução da apresentação de antígenos para as células CTL e da resposta mediada pelas células NK	E5 previne o transporte do MHC I (HLA-A e HLA-B) para a membrana celular por meio de três mecanismos principais: i) impede a acidificação do complexo de Golgi, o que causa o acúmulo de MHC I na organela; ii) liga-se ao Bap31 (proteína 31 associada a célula B), por deslocar esta proteína do MHC I, causando a retenção desta molécula no RE e CG; iii) interage com o MHC I
<i>Downregulation</i> do MHC I, II	Por impedir a expressão gênica do MHC I e II E5 contribui para a imunoevasão viral
Inibição das atividades mediadas por CD1d	E5 liga-se a calnexina e, portanto, prende a CD1d dentro do RE, reduzindo assim os níveis de CD1d na membrana plasmática
Aumento da disponibilidade de EGF-R causando a <i>upregulation</i> da COX-2, VEGF e indução da proliferação	E5 liga-se e inibe a atividade da V-ATPase, impede a acidificação do endossomo e causa a degradação da EGF-R. Aumenta a reciclagem do EGF-R para a membrana plasmática; também atrasa a degradação do EGF-R por interferir no tráfego a membrana e

	interação com c-Cbl, resultando na redução da degradação do EGF-R mediada por esta proteína. Estas atividades levam a regulação positiva da COX-2, enzima essencial para a resposta inflamatória, e da VEGF, fator angiogênico.
Ativação de vias de sinalização dependentes e independentes de EGF-R	E5 ativa a MAPK, p38 e as proteínas quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2) independentemente da ativação do EGF-R, o que causa aumento na expressão de c-fos e c-jun (tipos de AP-1) e estimula a transcrição dos oncogenes E6 e E7. Além disso, E5 impede várias atividades imunoprotetoras. E5 pode também ligar-se ao EGF-R e outros receptores de fatores de crescimento por meio de interações hidrofóbicas e induz a sinalização dependente de ligante destes receptores.
Ativação da expressão gênica da caveolina-1 e gangliosídeo-1	A caveolina-1 e o gangliosídeo-1 são <i>upregulated</i> na membrana plasmática o que contribui para a imunoevasão viral e interferência sobre vias de transdução de sinal
<i>Upregulation</i> do IFN- β	A expressão gênica do IFN-β é induzida por E5 por meio do aumento dos níveis de IRF-1 (fator-1 regulatório de IFN) nas células infectadas
<i>Downregulation</i> da expressão gênica do TGF- β -RII e da sinalização TGF- β /SMAD	O E5 atenua a sinalização por TGF-β/SMAD por prevenir a expressão gênica do TGF-β-RII. Também reduz a fosforilação do SMAD e sua translocação para o núcleo
Indução da invasão	E5 induz a expressão de MMP-1 e MMP-9

Referência: (BARBARESI et al., 2010; DE FREITAS et al., 2017; VENUTI et al., 2011)

2.7 CAVEOLINA-1

A caveolina-1 foi a primeira de três proteínas caveolina identificadas. É composta por 178 aminoácidos que compõem uma proteína de tamanho entre 21 e 24 kDa e que podem estar sob duas isoformas (α e β). Sua estrutura é formada por três porções, sendo uma central transmembranar hidrofóbica contendo cerca de 33 aminoácidos, e duas hidrofílicas voltadas para o citosol, as N- e C-terminais (Figura 8). É encontrada predominantemente na membrana plasmática de células em sua fase terminal de diferenciação, como adipócitos, fibroblastos, pneumócitos I, células epiteliais, endoteliais e do músculo liso, sendo expressa de modo variado entre os tecidos (THOMAS; SMART, 2008).

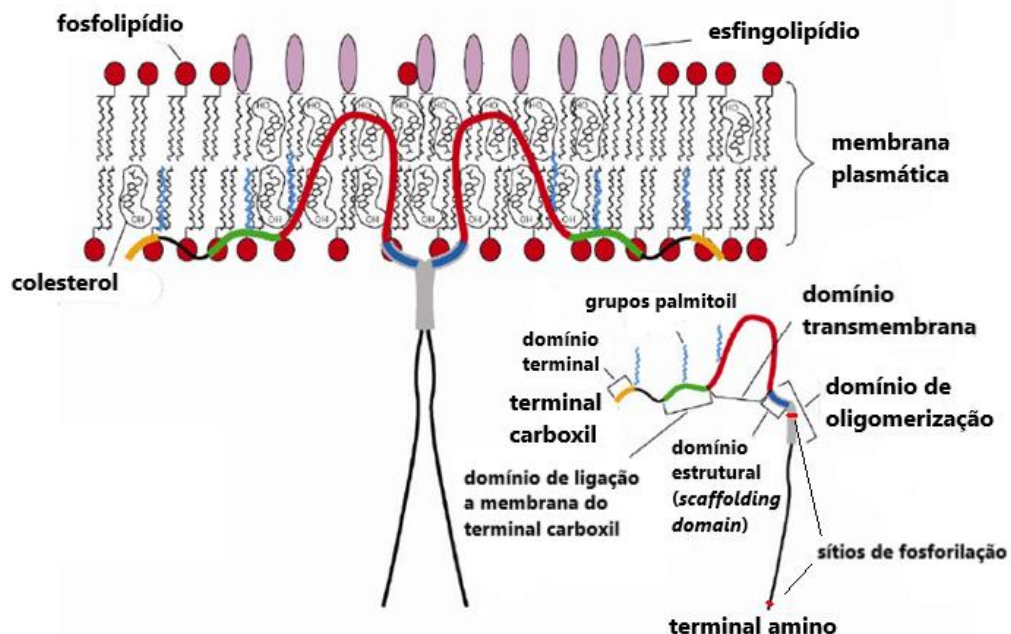


Figura 8. Estrutura da caveolina-1. A cav-1 apresenta três regiões principais em sua estrutura: i) a porção transmembranar hidrofóbica central e as porções ii) N- e iii) C-terminais localizados no citosol. A primeira porção compreende os aminoácidos 102 a 134, apresenta forma semelhante a grampo de cabelo e está inserida no folheto voltado para o interior da célula, nunca alcançando a parte externa. A porção N-terminal (1-101) é importante por ligar a cav-1 ao colesterol e aos domínios de membrana ricos em esfingolípídio, além de ligar-se às moléculas de transdução de sinal (KISS; BOTOS, 2009). O domínio C-terminal (135-178) também é importante para fixação da proteína a membrana (por meio da presença dos grupos palmitoil em resíduos de cisteína). Além desses domínios, existem outros importantes como o domínio de oligomerização (61-101) e o domínio estrutural ou *scaffolding domain* (CSD) (82-101). Este último permite a interação com uma variedade de proteínas de sinalização que contenham o motivo de ligação a cav-1 (p.ex. família Src de tirosina quinases, eNOS, receptores acoplados a proteína G etc). Sítios de fosforilação no N-terminal são importantes para diversas atividades da proteína, como a internalização do complexo e migração celular (fosforilação do resíduo 14 de tirosina) ou em sua retenção no RE para entrada na via de secreção (fosforilação do resíduo 80 de serina) (HAARHUIS, 2009; SHATZ; LISCOVITCH, 2008). Fonte: modificado de (HAARHUIS, 2009).

A síntese da cav-1 ocorre de maneira dependente da partícula de reconhecimento de sinal no retículo endoplasmático e de forma como proteína integral. Sua primeira etapa de oligomerização ocorre no RE antes de ser transferida para o complexo de Golgi, onde ainda não possui o atributo de resistência a detergente. Esta propriedade é adquirida somente após a saída do CG, quando a cav-1 associa-se aos *lipid rafts* ("jangada lipídica"), adquire resistência ao detergente e finaliza seu processo de oligomerização. Acredita-se que o término da montagem molecular da cav-1 ocorra nos compartimentos tardios do CG e que a presença do colesterol e dos glicosfingolipídios seja crucial para este processo (PARTON; SIMONS, 2007).

A cav-1 destaca-se por ser a principal e indispensável proteína estrutural de membrana que compõe o complexo caveolae, uma estrutura presente nas membranas celulares que foi descrita pela primeira vez por Palade (1953) e Yamada (1955). Ao estudar células endoteliais do tecido cardíaco e do epitélio da vesícula biliar por microscopia eletrônica, respectivamente, esses dois pesquisadores descreveram este complexo como aspectos da membrana plasmática que apresentavam invaginações vesiculares esféricas de tamanho e forma regulares, que ocorriam de forma singular ou em conjunto e que se assemelhavam a pequenas cavernas (STAN, 2007). O papel da cav-1 é tão imprescindível para formação deste complexo que camundongos *null* para este gene apresentaram completa ausência destas organelas (WILLIAMS; LISANTI, 2005).

O complexo caveolae também pode ser chamado de *membrane lipid raft* – "jangada" lipídica de membrana (Figura 9) – por ser um subtipo dessa estrutura lipídica que contém a caveolina-1 como seu biomarcador principal (STAN, 2007). Pode ocorrer como invaginações únicas ou formar clusters com membrana não-caveolar entre eles, incluindo as invaginações cobertas por clatrina (PARTON; SIMONS, 2007). Contudo, independente das formas de apresentação que podem ocorrer, é importante salientar que a estrutura deste complexo representa um microdomínio único de membrana, isto é, perfaz uma região da membrana que contém uma organização ou composição própria e que difere do restante desta, estando vinculada ao status fisiológico da célula e às condições patológicas (THOMAS; SMART, 2008). Evidencia-se assim que a membrana plasmática não é homogênea, como apresentado no modelo mais comum.

A composição específica da caveolae também é útil para seu isolamento, já que apresenta diversos graus de insolubilidade a detergentes não-iônicos (p.ex. triton X-100). Para separação da caveolae, no entanto, o uso do triton X-100 (utilizado para separação ou detecção dos *lipid rafts*) não é suficiente por si só por não distinguir este complexo de outros *lipid rafts*, assim como a execução da ultracentrifugação por gradiente de sacarose (HAARHUIS, 2009). Sendo assim, para estudo da composição específica da caveolae, é adotado outras abordagens para seu isolamento como o uso do GTP e posterior hidrólise por dinamina ou o uso de anticorpos monoclonais caveolina específicos, por exemplo (THOMAS; SMART, 2008).

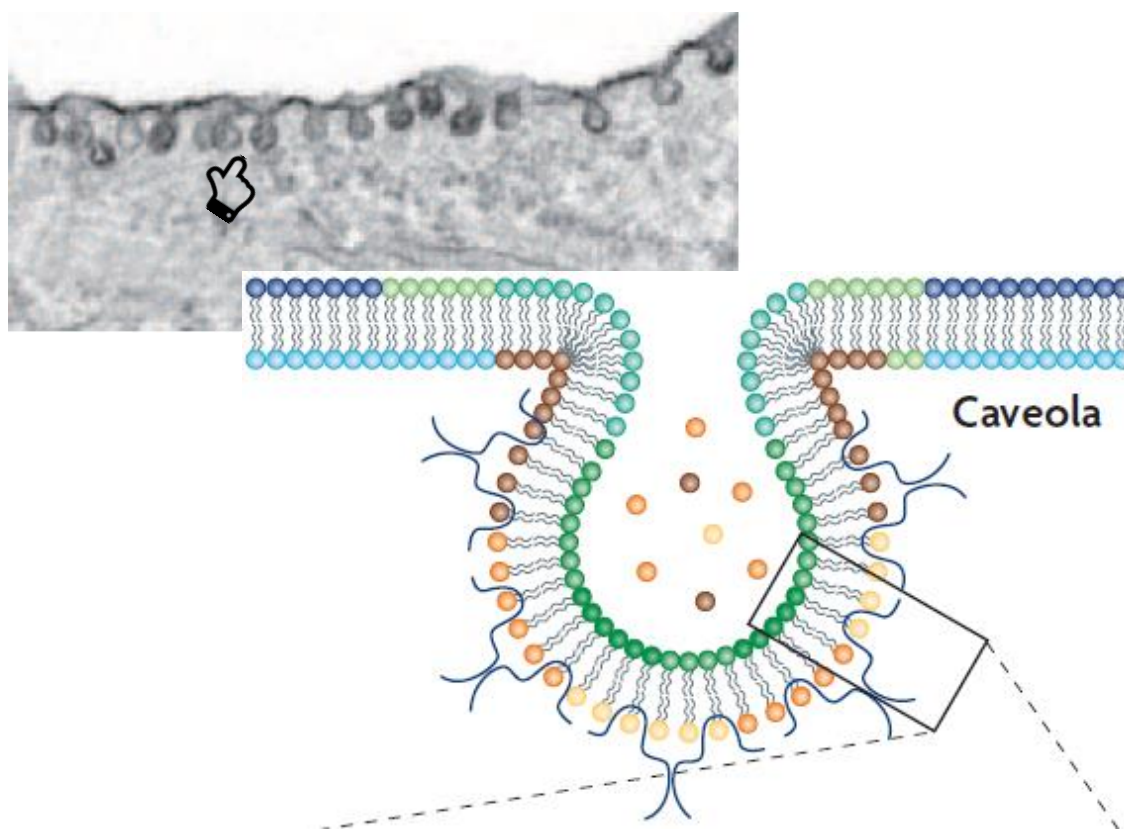


Figura 9. Estrutura e composição do complexo caveolae *lipid raft*. O complexo caveolae é composto primordialmente pelo colesterol, atributo característico de todo *lipid raft*, e seus níveis são volúveis. Especificamente, a caveolae possui a caveolina-1, proteína fundamental para manutenção da sua estrutura, pois forma complexos com lipídios e outras proteínas. Estas estruturas membranares ainda se conectam com importantes proteínas de transdução de sinal, como as proteínas G. Tanto em termos qualitativos quanto quantitativos, componentes do complexo integram para tornar a sua composição única, distinguindo-o dos outros *lipid raft* em suas funções. (THOMAS; SMART, 2008). Fonte: (PARTON; SIMONS, 2007).

Com o desenvolvimento da microscopia eletrônica, no decorrer das décadas seguintes à descoberta de Palade e Yamada, este complexo foi sendo descrito e sua composição detalhada foi sendo constituída gradualmente. Apresentando cerca de 50

a 100 nm de diâmetro, estima-se que a caveolae contenha cerca de 144 moléculas da cav-1 juntamente com outras 20.000 de colesterol, o qual é indispensável para formação do complexo e transcrição do gene da cav-1 (KISS; BOTOS, 2009; PARTON; SIMONS, 2007).

Existem ainda na constituição desse complexo, a presença de glicoesfingolípídios e esfingomiélinas em densidades relativamente elevadas (comparativamente a membrana plasmática como um todo) (PARTON; SIMONS, 2007), além de outras proteínas integrais que também se ancoram em ácidos graxos saturados (p.ex. glicosilfosfatidilinositol e colesterol) situados na membrana plasmática (SIMONS; TOOMRE, 2000). Entre elas estão as proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol, as proteínas transmembrana e as proteínas duplamente aciladas como as Src quinases (THOMAS; SMART, 2008). Estas últimas são responsáveis pela fosforilação da cav-1 que leva ao brotamento da caveolae para o interior da célula (KISS; BOTOS, 2009) – o processo de internalização da caveolae é descrito com mais detalhes na figura 11.

Proteínas do citoesqueleto também contribuem de maneira importante para o ancoramento e fixação da caveolae na membrana plasmática, como a cortactina, a filamina, que promove uma ligação cruzada entre dois filamentos de actina e a cav-1, e as integrinas, que retêm a caveolina fosforilada em estruturas especiais denominadas de aderências focais. Estas proteínas impedem, portanto, o destacamento do complexo da membrana plasmática, além de contribuírem para o deslocamento da caveolae pelo citosol, uma vez que este já tenha se desprendido da membrana (KISS; BOTOS, 2009).

Em seguida a internalização da caveolae, as etapas que decorrem são pouco conhecidas. Sabe-se que, em alguns casos, a internalização da caveolae pode seguir a via de endocitose clássica, ou seja, por meio da fusão com os endossomos e deslocamento para o complexo de Golgi. É sugerido que a fusão da caveolae com os endossomos precoces ocorra por meio Rab5-dependente, uma pequena GTPase, e que a comunicação caveolae-endossomo-caveossomo seja bidirecional. Além disso, o colesterol e proteínas como a dinamina, quinases e fosfatases contribuem para fusão com os endossomos e para a progressão da via endocítica: a primeira por conectar clusters de caveolae a superfície e os últimos por promoverem e regularem fosforilações chave, respectivamente. A própria cav-1 contribui para regulação da via pois é capaz de interagir com fosfatases, como a PP2A, e inibir a fusão dos

caveossomos com os endossomos e depois com os lisossomos. Exemplos deste tipo de internalização ocorrem para a toxina da cólera, o vírus SV40 e para o HPV31 (que será descrito com detalhes na seção 2.5.3) (KISS; BOTOS, 2009).

Outros estudos, por sua vez, indicam uma via alternativa. Nesta via, o caveossomo funcionaria como um endossomo precoce e seu conteúdo é deslocado para o complexo de Golgi e retículo endoplasmático sem ocorrer fusão com os lisossomos (KISS; BOTOS, 2009).

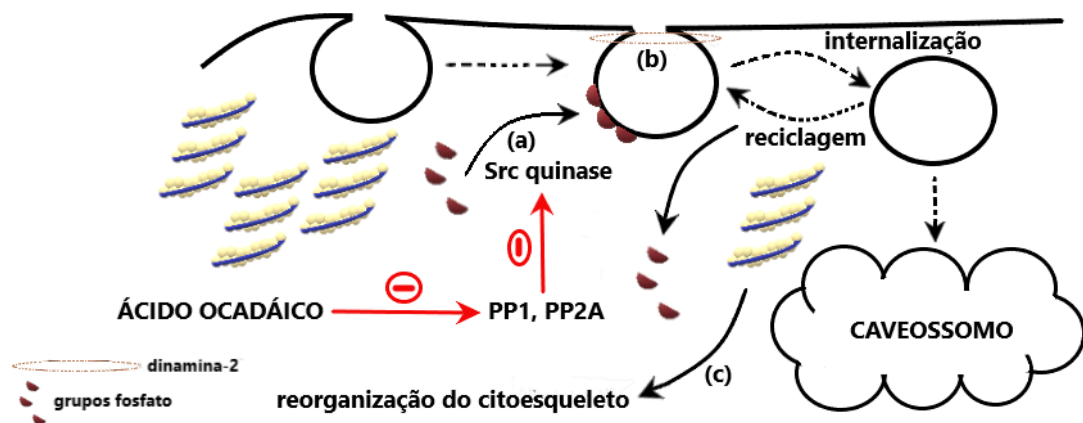


Figura 10. Internalização da caveolae. Para ocorrência da internalização da caveolae uma série de processos biológicos são necessários, entre eles: (a) A fosforilação dos resíduos de tirosina da cav-1 e da cav-2 ocasiona a internalização da caveolae e, portanto, fosfatases e inibidores de fosfatases apresentam papel chave nesse processo. Acredita-se que inibidores de fosfatases, como o ácido ocadáico, inibem a atividade de fosfatases que então, tornam-se incapazes de inibir a ação de quinases, permitindo a fosforilação da cav-1 e internalização da caveolae. (b) atividade da dinamina-2: de forma transiente, esta proteína promove a fissão da caveolae pelo estreitamento do “pescoço” do complexo. (c) reorganização do citoesqueleto: moléculas de actina promovem a fixação da caveolae na membrana plasmática e, portanto, alterações em sua organização são necessárias para internalização da caveolae além de contribuir para seu deslocamento no citoplasma por meio dos rastros de microtúbulos após o desprendimento da membrana plasmática. É observado que para entrada de caveolae carregados com vírus (como o HPV) monômeros de actina são recrutados formando aglomerados que contribuem para estabilização e locomoção da estrutura (KISS; BOTOS, 2009).

2.7.1 Funções da caveolina-1

Foi descrito anteriormente que a cav-1 é componente central do complexo caveolae, um microdomínio de membrana que apresenta composição própria. É por meio da estrutura molecular desta proteína, como apresentado, que a caveolae se relaciona com diversas proteínas quinases e de sinalização essenciais para garantia da homeostase celular. As funções da caveolina-1, portanto, decorrem de tais interações.

Sendo assim, o complexo caveolae, por meio da cav-1, promove importante funções celulares, entre elas a endocitose, a transcitose, o metabolismo do colesterol, o transporte vesicular e a transdução de sinais. Todas essas atividades são chave para manutenção da homeostase celular, pois estão envolvidos no crescimento e ciclo celular, apoptose, angiogênese, invasão e metástase, fosforilação oxidativa, estresse oxidativo e resposta imune (CARVER; SCHNITZER, 2003; STAN, 2007; THOMAS; SMART, 2008). As atividades homeostáticas da cav-1 podem ser vistas na tabela 4.

Como consequência, a caveolae acaba por contribuir para a patogênese de enfermidades importantes, como a diabetes, as infecções virais e o câncer. Este complexo promove a entrada de diversos tipos virais em suas respectivas células alvo, como o SV40, o HIV, o poliovírus, o HPV, além de internalizar outras estruturas como a toxina da cólera e certas bactérias que expressam FimH (KISS; BOTOS, 2009; SMITH; CAMPOS; OZBUN, 2007). Como relaciona-se a diversas funções celulares ligadas a homeostase celular, participam na carcinogênese de vários tumores, incluindo o cervical (FU et al., 2017).

Tabela 4. Funções da caveolina-1.

FUNÇÃO	CONTRIBUIÇÃO DA CAVEOLINA-1	REFERÊNCIA
Metabolismo do colesterol	O papel da caveolina-1 sobre o transporte do colesterol foi demonstrado pelas atividades da progesterona e da colesterol oxidase (que resultaram na diminuição dos níveis de cav-1 simultaneamente ao do colesterol somente na caveolae), e pela mediação de um complexo chaperona lipoproteico pelo qual a cav-1 liga-se ao colesterol e o desloca do RE para a caveolae e vice-versa a depender de sua composição (HSP56 e anexina II respectivamente).	(THOMAS; SMART, 2008)
Regulação da via da proteína G	Subunidades como a G_{α} podem estar presente no interior da caveolae quando inativas e abandonar este complexo quando ativas o que sugere modulação da caveolae	(THOMAS; SMART, 2008)

	sobre a ativação desta importante via de sinalização.	
Estresse oxidativo	Nas células endoteliais a caveolina-1 interage com a eNOS (óxido nítrico sintase endotelial), por meio do <i>scaffolding domain</i> (CSD), inibindo-a. A composição lipídica da caveolae também altera a atividade desta enzima.	(THOMAS; SMART, 2008)
Doenças relacionadas ao Prion	Foi observado a presença de proteínas prions no interior da caveolae e a conversão para a forma patológica da proteína (de PrP ^C para PrP ^{Sc}) pode estar ligada aos gangliosídeos. A cav-1 também pode estar envolvida na sinalização não patológica da PrP ^C .	(THOMAS; SMART, 2008)
Regulação da via TGFβ/Alk1/Smad1	A cav-1 foi vista ser um regulador positivo da via de sinalização da TGFβ/Alk1/Smad1 em fibroblastos da derme humana. Esta característica também foi vista em outros tipos celulares.	(HAINES et al., 2012; MEYER et al., 2011; SANTIBANEZ et al., 2008)
Regulação da via Wnt/β-catenina	Inibe a sinalização mediada por Wnt por recrutar β-catenina para a caveolae e, assim, bloquear a transcrição mediada por esta molécula. Também foi vista ativar esta via por promover a liberação da β-catenina do complexo.	(SHATZ; LISCOVITCH, 2008)
Regulação da via PI3K/Akt	Regula positivamente esta via mantendo assim a sobrevivência celular.	(SHATZ; LISCOVITCH, 2008)
Regulação da via JAK/STAT	Inibe esta via por meio da interação com a JAK2.	(SHATZ; LISCOVITCH, 2008)

Regulação da via MEK1/Erk1/2	Foi visto que a cav-1 recombinante bloqueou a transdução de sinal desta via por inibir diretamente a MEK1 e Erk1/2 através do domínio CSD.	(SHATZ; LISCOVITCH, 2008)
Regulação de sinais do EGF-R e Raf-1	A cav-1 inibe sinais par ao núcleo provindos da ativação do EGF-R e Raf-1	(SHATZ; LISCOVITCH, 2008)

2.7.2 Caveolina-1 e o câncer

De modo geral, a respeito do processo carcinogênico, a cav-1 já foi reportada estar relacionada tanto com a sua supressão quanto a sua promoção, estando seu papel vinculado ao tipo de tumor e ao tecido em que é analisado (tecido cancerígeno x estroma) (THOMAS; SMART, 2008). Sua importância no câncer deve-se, principalmente, por modular inúmeras vias de sinalização intracelular e, consequentemente, por contribuir na ativação ou inibição de diversos fatores de transcrição. Sabe-se que vários receptores de tirosina quinase assim como moléculas de sinalização estão situados dentro da caveolae, como por exemplo, EGF-R, H-Ras, Raf quinase, ERK1/2, E-caderina, Shc, Grb2, eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) entre outros e, portanto, tem sua atividade regulada pela composição deste complexo, incluindo a caveolina-1 (BOURAS; LISANTI; PESTELL, 2004; ENGELMAN et al., 1998a; LIU et al., 1997, 1996; MINEO et al., 1996).

Embora esteja relacionado tanto a supressão quanto a promoção tumoral (tabela 5), a cav-1 associa-se ao primeiro com maior frequência (TORRES et al., 2006), como são os casos do câncer de mama, ovário, cervical, estômago, cólon, entre outros (THOMAS; SMART, 2008; WILLIAMS; LISANTI, 2005). Curiosamente, a própria localização do gene da cav-1 aponta tal atividade, já que ocorre em um locus sugerido por desempenhar atividade supressora de tumor em camundongos (6-A2) e humanos (7q31.1) (ENGELMAN et al., 1998a; ENGELMAN; ZHANG; LISANTI, 1998). Contudo, no câncer prostático, por exemplo, a cav-1 é sugerida contribuir para a progressão carcinogênica, assim como ocorre outros tipos para os cânceres de pâncreas, esôfago, tireóide e outros (THOMAS; SMART, 2008).

Tabela 5. Papel da caveolina-1 em diversos tipos de câncer

TIPO DE CÂNCER	PAPEL DA CAVEOLINA-1	REFERÊNCIA
Mama	Existem várias evidências que demonstram o papel protetor da cav-1 sobre o desenvolvimento do câncer de mama. Entre eles diversos estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . A expressão reduzida ou ausente deste gene foi constatada em diversas linhagens de câncer de mama (e.g. MCF-7, T47-D etc) havendo uma correlação inversa com os níveis de expressão de genes ou vias de sinalização chave para a carcinogênese mamária, como $Er\alpha$, ciclina D1, HER2, cascatas de sinalização envolvidas na mitogênese, como Ras-p42/44 MAPK e Prl-R/Jak2/STAT5a, e envolvidas no crescimento independente de ancoragem e migração, como EGF/MAPK, integrina/Fyn/ERK1/2 e EGF/E-caderina/Wnt/ β -catenina. Quando a expressão da cav-1 foi induzida novamente, houve redução das atividades de MMP-2 e -9, na invasão a matriz extracelular e na taxa de proliferação, tanto em cultura como quando essas células foram introduzidas em camundongos metastáticos. Em outro estudo com camundongos, a presença do gene da cav-1 resultou na diminuição da carcinogênese em comparação aos camundongos <i>knockout</i> para este gene. Também é visto com frequência perda da heterozigose e de mutação no códon 132 no gene da cav-1, que ocorre em 16% dos pacientes com câncer de mama. Essa mutação, por exemplo, leva ao aumento do crescimento	(BOURAS; LISANTI; PESTELL, 2004; THOMAS; SMART, 2008)

independente de ancoragem e da motilidade celular.

- Próstata** Foi visto que a expressão de cav-1 estava elevada no câncer de próstata e, quando este gene foi anulado em camundongos (*null mice*), houve menor frequência de tumores invasivos além de redução na taxa de metástase. Em outro estudo, utilizando camundongos como modelo de adenocarcinoma transgênico prostático, foi observado níveis aumentados de expressão em comparação com o epitélio normal de próstata. A cav-1 é responsável por manter ativada a via de sinalização PI3K/Akt, por meio da inibição das fosfatases PP1 e PP2A, conservando a capacidade de sobrevivência celular. Foi visto também que a cav-1 é secretada de células de câncer de próstata estando em níveis aumentados nestas células. Também foi visto estar com níveis séricos aumentados em pacientes com esse tipo de câncer. Foi reportado que a cav-1 foi capaz de induzir a sobrevivência celular e a angiogênese. (SHATZ; LISCOVITCH, 2008; THOMAS; SMART, 2008; THOMPSON et al., 2010)
- Pulmão** Níveis consideravelmente diminuídos da cav-1 foram encontrados em linhagens derivadas de carcinoma de células escamosas (NCI-H157, NCI-H125, NCI-2170 e KLN-205) comparados com células epiteliais normais de pulmão e células não-transformadas de células NHI 3T3. (RAZANI et al., 2000)
- Pâncreas** Foi encontrado níveis super-expressos da cav-1 em linhagens de câncer pancreático, assim como em modelos *in vivo* e em amostras de tumores pancreáticos de pacientes, além de terem sido associados a um pior prognóstico. (CHATTERJEE et al., 2015; LIN et al., 2005; LIU et al., 2014a)

Quando sua expressão foi interrompida houve redução da proliferação, da formação de colônias, da invasão e da resistência ao tratamento.

Cólon Observou-se que o aumento da expressão de (THOMAS; DR5 e outros componentes da sinalização da morte celular na caveolae mediada pela inibição da COX-2 aumentou a apoptose mediada por TRAIL. SMART, 2008)

Uma das maneiras que a cav-1 impede o desenvolvimento de tumores ocorre por meio da supressão da mitogênese, do crescimento independente de ancoragem, da migração e invasão. Isso decorre através da inibição da atividade de proteínas quinases, como as da família Src, os receptores de tirosina quinase, como o EGFR e PDGFR, e as presentes nas vias de sinalização, como as das cascatas de Ras-p42/44 MAPK e da PI3K (figura 11). Esses dados foram constatados *in vitro*, por meio da utilização de linhagens celulares deficientes de cav-1, como a NIH 3T3, ou de modelos *in vivo*. (BOURAS; LISANTI; PESTELL, 2004; COUET; SARGIACOMO; LISANTI, 1997; ENGELMAN et al., 1998a; GALBIATI et al., 1998; LI; COUET; LISANTI, 1996).

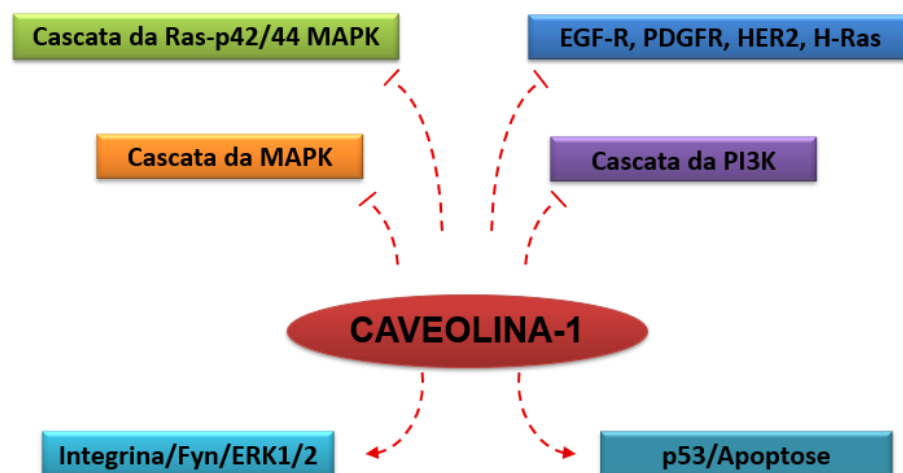


Figura 11. Vias de sinalização que sofrem interferência da caveolina-1. A caveolina-1 é capaz de modular diversas vias de sinalização chave como descrito no texto.

Por exemplo, foi visto que em células NIH 3T3 transformadas por H-Ras e v-Abl (KOLESKE; BALTIMORE; LISANTI, 1995) ou com HER2 ativado por mutação (ENGELMAN et al., 1998b), houve considerável redução dos níveis de cav-1 que foi

restaurado com PD98059 (potente inibidor específico de MEK). Um outro estudo constatou que a ausência ou deficiência da cav-1 foi suficiente para causar transformação celular, hiperatividade da via Ras-p42/44 MAPK e indução de tumores em camundongos imunodeficientes, sendo estes reversíveis à restauração dos níveis de cav-1 (GALBIATI et al., 1998). A via Ras-p42/44 é uma cascata central de sinalização envolvida na mitogênese e no crescimento celular independente de ancoragem sendo assim capaz de induzir transformação celular.

Outra forma que a cav-1 induz a supressão do tumor é por meio da regulação do ciclo celular. Foi visto que a cav-1 estava associada à inibição do crescimento celular por causar aprisionamento na fase G₀ por mecanismo dependente de p53 e dos domínios *scaffolding* e C terminal em modelos *in vitro* e *in vivo*. Também foi visto neste estudo que a cav-1 ocasionou aumento da sensibilidade celular a apoptose induzida por estaurosporina (GALBIATI et al., 2001). Outros estudos também relataram a relação inversa da expressão desta proteína e a proliferação celular (RAZANI et al., 2001).

A respeito das células estromais que circundam o tumor, também foi visto uma relação de diminuição de seus níveis com a ocorrência do câncer. Foi reportado que a perda da expressão proteica no estroma é um poderoso biomarcador que prediz a recorrência precoce do tumor, metástase e prognóstico desfavorável para pacientes com câncer de mama (WITKIEWICZ et al., 2009). Em fibroblastos deficientes de TFAM, os quais demonstram evidência de estresse oxidativo mitocondrial apresenta perda considerável da expressão proteica da caveolina-1 (BALLIET et al., 2011).

Quanto a promoção tumoral, foi visto que a cav-1 causava indução da transformação e da metástase em alguns cânceres. Níveis elevados desta proteína foram encontrados no adenocarcinoma de cólon (FINE et al., 2001), no colorretal metastático (ARIELLY et al., 2012), no prostático (THOMPSON et al., 2010) e em metástase de câncer mamário (YANG et al., 1998). No tecido tumoral a expressão de caveolina está associada ao aumento de sobrevivência, da agressividade e do potencial metastático do tumor (CARVER; SCHNITZER, 2003), sendo sugerido como biomarcador para evidenciar esta última condição de evolução do câncer (ARIELLY et al., 2012). Portanto, a caveolina apresenta valor clínico tanto pelo seu potencial prognóstico e preventivo, quanto pelo seu potencial terapêutico.

Uma das maneiras que a cav-1 pode contribuir para a carcinogênese é por meio de sua participação na composição dos *lipid droplets* em vários tipos celulares.

Existe a suspeita que os lipid droplets possam contribuir no processo carcinogênico, pois sua biogênese é aumentada nesta circunstância. Estas regiões na membrana plasmática relacionam-se com a carcinogênese principalmente por contribuírem para a ativação de vias inflamatórias, como à produção de eicosanoides e de transdução de sinal (p.ex. ativação de proteínas quinases como a ERK1 e -2, PI3K, p38, PKC) (BOZZA; VIOLA, 2010).

2.7.3 Caveolina-1 e o HPV

Como citado previamente, o complexo caveolae contribui para a entrada de diversos vírus para o espaço intracelular, e o mesmo ocorre para o HPV. A passagem desse vírus através da membrana plasmática ocorre por duas vias a depender do genótipo viral: pela via da caveolina ou pela via da clatrina, sendo o principal representante da utilização da via da caveolina o HPV31 e o da clatrina o HPV16.

Foi visto que o complexo caveolae foi indispensável para a entrada do HPV31 juntamente com a dinamina-2, uma proteína que promove o deslocamento das vesículas da superfície celular tanto na via da caveolae quanto na da clatrina (SMITH; CAMPOS; OZBUN, 2007). Ao ser internalizado, o HPV31 é invaginado permanecendo dentro do caveossomo para depois ser transferido para o endossomo precoce por meio da ação da Rab5 GTPase, e não para o complexo de Golgi e/ou retículo endoplasmático (como seria esperado para a via da caveolina). Em seguida, o genoma do HPV31 é expelido do endossomo devido a diminuição do pH (semelhantemente ao HPV16) para enfim, ser integrado ao genoma da célula hospedeira. A ação da Rab5GTPase, assim como a acidificação do endossomo, são primordiais para que a infecção do HPV31 ocorra: o primeiro é fundamental para o deslocamento viral do caveossomo para o endossomo enquanto o segundo é necessário para o desnudar o genoma viral e/ou promover o escape do endossomo (SMITH et al., 2008). Para a entrada do HPV16, no entanto, a caveolae não se mostrou essencial, sendo a via da clatrina imprescindível neste caso (SMITH; CAMPOS; OZBUN, 2007). O que é destacável nestes dados apresentados é que o HPV31 utiliza ambas as vias do caveossomo e endossomo para promoção da infecção.

2.7.4 Caveolina-1 e o câncer cervical

Poucos estudos tentaram esclarecer sobre o papel da cav-1 no desenvolvimento do câncer cervical. Em estudo em que foi avaliado um painel de linhagens de câncer cervical (SiHa, H1-Hela, Hela-229 e SW-756), foi observado que a cav-1 apresentou níveis reduzidos de expressão gênica nestas linhagens celulares quando comparados com células epiteliais escamosas normais, e que a expressão de E6 foi responsável pela regulação negativa deste gene. Quando a expressão da cav-1 foi restabelecida em SiHa foi observado acentuada redução do número de colônias em comparação com o controle com o vetor sem a cav-1 e contendo apenas a proteína verde fluorescente (RAZANI et al., 2000).

Em outro estudo, contudo, a presença do vírus gerou resultados diferentes. Por influência do oncogene E5/16, houve aumento da expressão da cav-1 na membrana plasmática de células ectocervicais humanas em cerca de 6x (em relação a oncoproteína com mutação de 10 aminoácidos a menos no C-terminal) e 3,9x (em relação ao controle negativo – vetor vazio) mensurado por citometria de fluxo, o que evidencia o papel crítico do C-terminal para gerar este efeito. Além disso, foi visto que esta oncoproteína esteve presente em *lipid raft* imaturos, por ter sido insolúvel ao triton X-100 a 4°C, e pela co-localização com a calnexina (proteína da membrana do RE) observada por microscopia de imunofluorescência (SUPRYNOWICZ et al., 2008).

2.8 GANGLIOSÍDEO-1 E A BETA-1,3-GALACTOSILTRANSFERASE 4

O gangliosídeo-1, também denominado de monosialotetrahexosilgangliosídeo, é um glicoesfingolípido (ceramida e oligossacarídeo) membro da série ganglio dos gangliosídeos que contém um resíduo de ácido siálico, o ácido N-Acetil- α -neuraminico (figura 12). Este glicolípido é sintetizado por uma série de reações os quais formam quatro séries de gangliosídeos que são determinados pela quantidade de resíduos de ácido siálico ligados a lactosilceramida (tipo de ceramida⁶ incorporada a lactose). A última é catalisada pela

6. A ceramida pertence à família de moléculas de lipídios cerosos. É composto pela esfingosina (cadeia de hidrocarboneto insaturado com amino álcool na posição do carbono-18) e ácido graxo, como por exemplo, o ácido esteárico.

glicosiltransferase denominada de beta-1,3-galactosiltransferase 4 (β 3GAL4) ou ainda de GM1 sintase (termo que usaremos neste texto), a qual transfere a β -D-Galactose ao gangliosídeo-2 (figura 13) (GROUX-DEGROOTE et al., 2018).

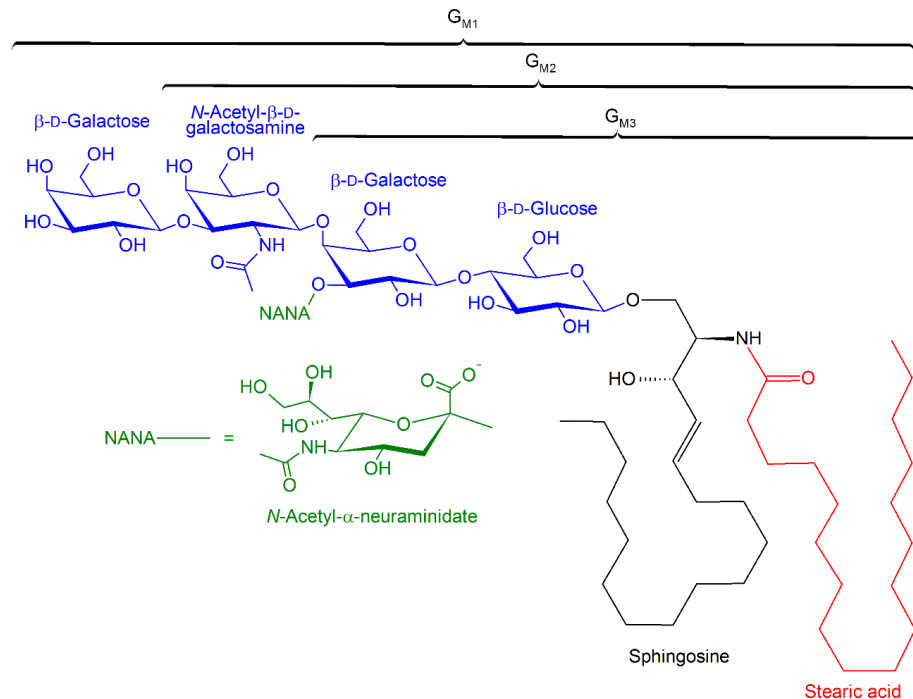


Figura 12. Estrutura dos gangliosídeos-1, -2 e -3. GM1, GM2 e GM3 fazem parte da série a dos gangliosídeos. O GM3 é formado pela lactosilceramida (ceramida + lactose) mais o resíduo de ácido siálico (ácido N-acetil- α -neuramínico). O GM2, por sua vez, possui um resíduo de monossacarídeo a mais, o N-acetil- β -D-galactosamina. Por fim, o GM1 apresenta a estrutura do GM2 com a adição de um resíduo de β -D-galactose a mais. Fonte: (PURI., 2014).

Assim como a caveolina-1, o GM1 é componente estrutural essencial do *lipid raft* e, por isso, também participa de inúmeros processos biológicos, como a fluidez da membrana plasmática, o reconhecimento celular e, principalmente a transdução de sinal (figura 14). Essencialmente devido a essa característica, o GM1 contribui para a proliferação, diferenciação, apoptose, angiogênese e a resposta imunológica (YU et al., 2011).

Devido a todos esses efeitos fisiológicos o GM1, assim como os outros gangliosídeos de modo geral, contribui ativamente para a geração de processos patológicos, como a síndrome de Guillain-Barré, doença de Alzheimer, infecções virais (p.ex. influenza) etc (YU et al., 2011). Além desses, estes compostos lipídicos são frequentemente associados a vários tipos de câncer. principalmente os de origem neuroectodermis como o melanoma, neuroblastoma, glioblastoma, câncer de mama

e outros como o de pulmão, ovário, cervical, estando envolvidos frequentemente com a invasão e a metástase (GROUX-DEGROOTE et al., 2018).

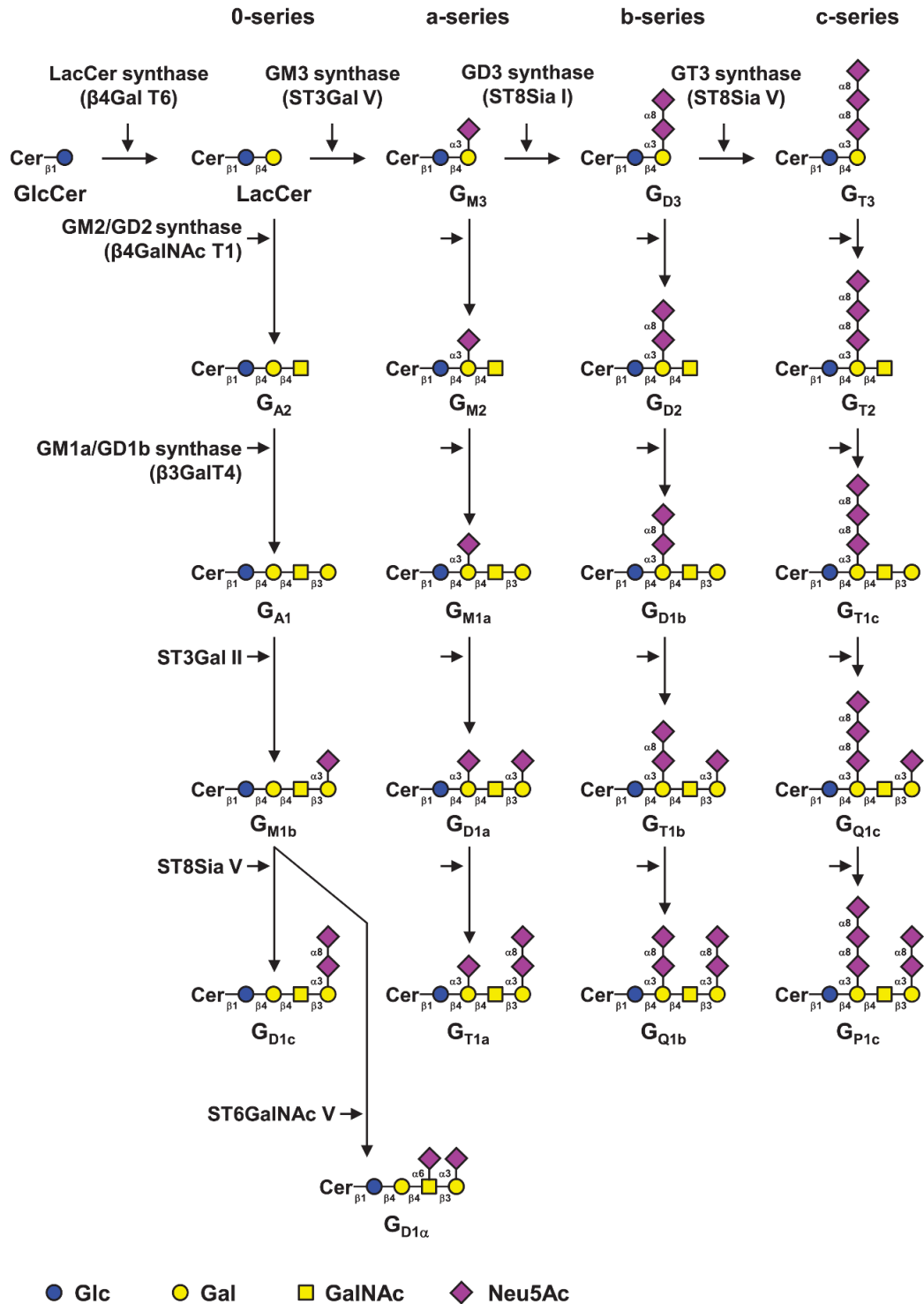


Figura 13. Biossíntese do gangliosídeo-1.
Fonte: (GROUX-DEGROOTE et al., 2018).

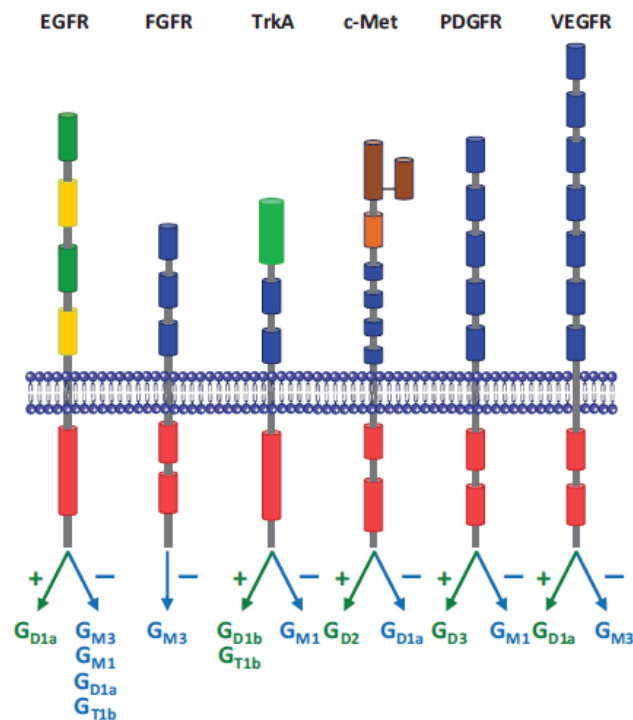


Figura 14. Principais receptores de tirosina quinase modulados pelo GM1 e outros gangliosídeos. Os receptores acima representados iniciam e interferem em inúmeras vias de transdução de sinal que culminam na modulação, ativação/inibição e/ou expressão de inúmeras proteínas centrais na manutenção da homeostase celular (ciclo celular, apoptose, resposta imune etc) e, conseqüentemente, na ocorrência do câncer. Fonte: (GROUX-DEGROOTE et al., 2018).

Por conta dos efeitos dos gangliosídeos na carcinogênese, as atividades das glicosiltransferases (GTs) têm sido avaliadas em diversos tipos de câncer quanto sua capacidade biomarcadora e, portanto, prognóstica, assim como na imunoterapia. Geralmente seus níveis elevados refletem agressividade tumoral que pode ocorrer, por exemplo, devido desregulação das modificações epigenéticas associadas a expressão destas enzimas envolvidas na síntese desses compostos. Entre outros processos de regulação da síntese das GTs estão a glicosilação no complexo de Golgi, a atividade de fatores de transcrição (os quais são desconhecidos em sua maioria), o uso de vias de transdução de sinal, entre outros. Um exemplo reflete-se na atividade do NF- κ B: o TNF é capaz de induzir a super-expressão do gene da GD3 sintase (*ST8Sia1*) em células de câncer de mama negativas para o receptor de estrogênio (GROUX-DEGROOTE et al., 2018).

Alguns estudos avaliaram os níveis e o papel do GM1 em diversos tipos de câncer quando foram constatados efeitos anti-carcinogênicos como por exemplo:

i. no câncer de cólon: níveis diminuídos de GM1 foram associados a redução da atividade das células NK e aumento da metástase para o fígado (SHIRATORI et

al., 1992); em outros trabalhos foram vistos efeitos anti-metastáticos (VOGEL et al., 1996) e anti-crescimento celular (KWAK et al., 2011);

ii. a GM1 sintase, assim como outras sintases (GD1b e a GA1) foram introduzidas em linhagem de melanoma, o que ocasionou redução do crescimento celular e invasão (DONG et al., 2010);

Outros estudos, por sua vez, associaram o GM1 a efeitos pró-carcinogênicos e metastáticos:

i. o GM1, juntamente com outros gangliosídeos (GM2, GM3 e GD1a), induziram a angiogênese e o crescimento tumoral em modelo de células DKO (células geneticamente incapazes de sintetizar gangliosídeos) de câncer murino (LIU et al., 2014b);

ii. o GM1 e outros gangliosídeos das séries b e c causaram efeitos imunossupressores por causarem a diminuição nos níveis de IFN- γ e aumento nos de IL-4, em cultura de esplenócitos e células T (CD4⁺ e CD8⁺) tratadas com estes glicosíngolipídios, sendo os efeitos mais intensos no segundo ensaio (o aumento de IL-4 decorreu primordialmente das células T CD4⁺) (CRESPO et al., 2006); outros efeitos inibitórios sobre o sistema imune causados pelo GM1 e outros gangliosídeos também foram reportados no câncer (MCKALLIP; LI; LADISCH, 1999);

iii. em células normais de glândula mamária de murinos que foram submetidas à indução por TGF- β para ocorrência do EMT, foi visto redução do gene da GM1 sintase ($\beta 3GaIT4$) e da GA1. O aumento da expressão deste gene e consequente aumento nos níveis de GA1 impediu a ocorrência da EMT induzida por TGF- β e promoveu a manutenção da membrana da célula epitelial por meio da interação com as proteínas E-caderina e β -catenina (GUAN et al., 2010);

iv. a atividade da GM1 (sem o ácido siálico em sua estrutura) contribuiu para que células de câncer prostático tornassem-se metastáticas (VAN SLAMBROUCK et al., 2014);

v. foi visto que anticorpo anti-GM1 desempenhou potente atividade *in vitro* e *in vivo* contra o câncer de células pequenas de pulmão (PONATH et al., 2018);

vi. o GM1 induziu a expressão e a atividade da arginase-1, marcador central do macrófago M2. Além disso, induziu a secreção de CCL2 (proteína-1 quimioatraente de monócitos) por esses macrófagos, promovendo assim a angiogênese. Este gangliosídeo, dessa maneira, poderia induzir a diferenciação de macrófagos para o fenótipo M2 levando a uma série de outras atividades pró-carcinogênicas além da sua

indução direta para ocorrência da angiogênese (CHUNG et al., 2017). Inferindo-se uma possível atividade da GM1 no câncer cervical, por exemplo, sabe-se que os macrófagos M2 e a síntese de CCL2 são fatores importantes para a criação de um microambiente tumoral favorável a carcinogênese. Os primeiros induzem a resposta Th2, inibem as respostas CD8⁺ e CD4⁺ e promovem a angiogênese pela secreção do VEGF. Já a produção de CCL2 leva ao aumento exponencial da resposta inflamatória já que realiza o recrutamento de células pró-inflamatórias como os neutrófilos, mastócitos e células supressoras mielo-derivadas (BARROS et al., 2018a).

A respeito da modulação sobre a resposta imune, foi demonstrado que os gangliosídeos também são capazes de alterá-la levando a consequências sobre a carcinogênese. Estão comumente associados com a sua inibição, embora há estudos que relataram efeitos imunogênicos. Por exemplo, no câncer de pulmão o uso da α -GalCer e lipopolissacarídeos promoveram aumento da produção de IFN- γ e da resposta imune antigênica específica contra tumor, o que contribuiu para reduzir o crescimento tumoral (ZHUO; LI; GUAN, 2018). Por sua vez, como efeitos imunomodulatórios, foi visto que os gangliosídeos inibem intensamente os linfócitos T citotóxicos, bloqueiam a formação da sinapse imune e são expressos em níveis altos na superfície de células tumorais podendo serem úteis como mecanismos de evasão imune executados pelo HPV (SUPRYNOWICZ et al., 2008). Verificou-se também a ação do TGF- β (citocina imunomodulatória) sobre a expressão do gene da GM1 sintase ($\beta 3GalT4$) em modelo de células de glândula mamária de murinos (GROUX-DEGROOTE et al., 2018).

Também foi observado que a liberação de gangliosídeos ao meio extracelular estava associado a prevenção da resposta celular em vários níveis, incluindo a inibição da atividade das células dendríticas além das células citotóxicas. Por isso os níveis sorológicos do GM1 e outros gangliosídeos são comumente mensurados com o objetivo de fazer predições sobre a condição clínica da paciente.

Não existem muitos dados na literatura científica sobre a relação desta molécula e sua associação com o câncer cervical. Hamamura et al. (2005) demonstraram que houve redução do crescimento celular na linhagem de fibroblastos após a transfecção do gene GM1 sintase responsável pela síntese do gangliosídeo-1 comparados com os controles (HAMAMURA et al., 2005), o que contrasta com outros dados reportados que associam a presença destas moléculas ao aumento da

proliferação pelo receptor EGFR. A atividade deste receptor está diretamente ligada ao oncogene E5 (DE FREITAS et al., 2017).

Em outro estudo, em que também foi avaliado os níveis da cav-1, foi observado o aumento na expressão do GM1 na membrana plasmática e ambos foram associados à presença do oncogene E5 (HPV16). As células ectodermas não transformadas ou transformadas com E5 mutado (sem a presença de 10 aa no terminal C) não foram capazes de induzir o aumento da expressão nem da cav-1 nem do GM1 (SUPRYNOWICZ et al., 2008).

Por sua vez, Tanaka et al. (2016) avaliou a presença de vários gangliosídeos (incluindo o GM1) por meio da cromatografia com imunocoloração e qPCR (das várias galactosiltransferases) em várias linhagens de câncer cervical. Foram utilizadas linhagens de carcinoma escamoso (SKG-IIIb, Boku, HKUSP), adenocarcinoma (OMC-4, HCA-1), carcinoma adenoescamoso (HeLa) e carcinoma de célula pequena (HCSC-1). Foi visto que o GM3 esteve presente em maior quantidade em relação aos outros gangliosídeos enquanto o GM1 foi o mais frequente, estando presente em todas as linhagens de câncer cervical (TANAKA et al., 2016).

2.9 COX-2

O COX-2 é uma enzima quinase presente em células inflamatórias e imunes, como macrófagos, neutrófilos, fibroblastos etc. Apresenta 604 aa que formam dois sítios catalíticos cuja função é converter o ácido araquidônico, um ácido graxo poli-insaturado (liberado dos fosfolípidos das membranas celulares pela fosfolipase A2), em prostaglandinas (PGs) e outros eicosanoides. Estes compostos apresentam estrutura química formada por 20 carbonos, incluindo um ciclopentano de onde se originam duas cadeias laterais, e são responsáveis por desempenhar inúmeras funções biológicas no organismo (DIVVELA; CHALLA; TAGARAM, 2010).

Diferentemente da COX-1, a COX-2 é expressa de modo não-constitutivo. Sua síntese é induzida principalmente por IL-1 e TNF- α , quando um estímulo pró-inflamatório é produzido devido a presença de uma infecção, em condições carcinogênicas ou quando há a ocorrência de dano tecidual. A COX-2 também é capaz de produzir PGs em maior quantidade do que sua isoenzima, a COX-1, cuja síntese

desses compostos é importante para manutenção das funções fisiológicas normais no organismo (DIXON, 2003).

Sua região promotora é composta por 250 pb onde se inserem quatro elementos cis mais o TATA box (figura 15). Esses elementos estão associados a diversas vias e fatores de transcrição centrais na carcinogênese, como por exemplo, a via da MAPK e do NF- κ B (DIXON, 2003). No câncer cervical, destaca-se a via do NF- κ B, que sofre interferência da oncoproteína E5 (DE FREITAS et al., 2017), o TATA box, que é ativado pela ausência da atividade da p53 promovida pela ação da oncoproteína E6, e a ativação da via JNK-MAPK que leva a ativação do elemento CRE pela oncoproteína E7 (SUBBARAMAIAH; DANNENBERG, 2007), como também pela oncoproteína E5, por meio do feedback positivo induzido pelo aumento na síntese de PGE₂ (DE FREITAS et al., 2017) – algumas via de ativação da expressão da COX-2 são vistas na tabela 6.

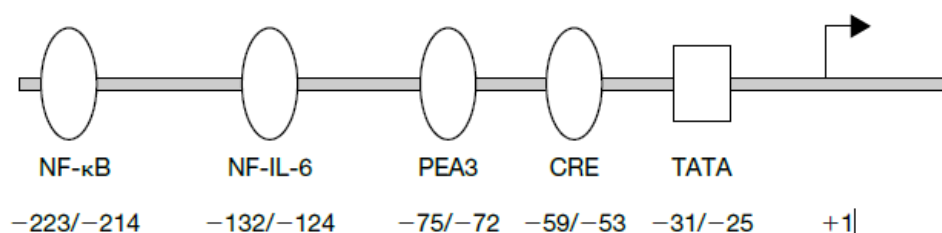


Figura 15. Região promotora do gene da COX-2. A região promotora do gene COX-2 é formada pelo TATA box, que é inibida pela atividade da p53; o elemento CRE, que é ativado pelo fator de transcrição AP-1, resultado da via de sinalização da MAPK; o elemento PEA3, que é ativado em resposta a sinalização por Wnt1/ β -catenina e mutações no gene APC; o elemento NF-IL-6, que é ativado pela ligação da proteína C/EBP por meio da cascata da MAPK dependente de Ras; e o elemento NF- κ B, fundamental pela ativação da transcrição associada pela inflamação no câncer e mediada pela ligação do NF- κ B. Fonte: (DIXON, 2003).

Tabela 6. Vias de ativação da expressão gênica da COX-2 de ocorrência ou de possível ocorrência no câncer cervical

VIA	REFERÊNCIA
E5/NF-1/AP-1/COX-2: E5 (HPV16) interage com o fator nuclear 1 (NF-1) resultando na indução da expressão do fator de transcrição AP-1 que, por sua vez, estimula a transcrição da COX-2.	(DE FREITAS et al., 2017; SALES; KATZ, 2012)
E5/NF-1/NF-κB/COX-2: Da mesma maneira como ocorre com AP-1 ocorre para o NF- κ B após a interação do E5 com o NF-1.	(DE FREITAS et al., 2017)

E5/EGF-R/COX-2: E5 (HPV16) induz o aumento da expressão do EGF-R na membrana celular que, por sua vez, aumenta a COX-2 por meio da sinalização intracelular. (DE FREITAS et al., 2017)

E5/COX-2/PGE₂/EP₄/cAMP/PKA/CREB/EP₄: E5 (HPV16) induz a expressão de EP₄ por mecanismo de feedback positivo: a ativação do receptor EP₄ pela ligação de PGE₂, leva a indução da via de transdução de sinal cAMP/PKA/CREB que ativa o promotor de EP₄ e sua transcrição. Além de o PGE₂ executar essa função de forma autócrina, também pode estimular a expressão de EP₄ de forma parácrina, de modo que os queratinócitos situados em um mesmo local possam seguir um processo de transformação em bloco e promover o desenvolvimento e expansão do câncer. (DE FREITAS et al., 2017; SALES; KATZ, 2012)

E6 e E7/EGF-R/Ras/MAPK/AP-1/COX-2/PGE₂: E6 e E7 (HPV16) induzem a expressão da COX-2 por meio da ativação da via de transdução de sinal do EGF-R, semelhantemente como ocorre com a oncoproteína E5 (HPV16). Sendo assim, o fator AP-1 liga-se ao elemento CRE no promotor da COX-2, ativando a transcrição do gene. (SUBBARAM AIAH; DANNENBERG, 2007)

COX-1/COX-2/PGE₂: Foi visto que a indução da expressão da COX-1 na linhagem de câncer cervical HeLa, houve um rápido e sustentado aumento na expressão da COX-2 e da PGE sintase, o que resultou no aumento da síntese de PGE₂. É sugerida que a COX-1 também execute papel carcinogênico já que sua expressão também é aumentada durante os estágios de desenvolvimento do câncer cervical. (SALES; KATZ, 2012)

IL-1/COX-2/PGE₂/IL-1 α : IL-1 é uma citocina produzida por linfócitos, monócitos, macrófagos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, e induz a expressão da COX-2 e a produção de PGE₂, o que resultou no aumento da capacidade metastática do tumor e na indução da síntese de IL-1 α por feedback positivo. (DIVVELA; CHALLA; TAGARAM, 2010)

IL-17/COX-2/PGE₂: a indução da expressão da COX-2 por IL-17 promoveu a diferenciação dos macrófagos/monócitos para o fenótipo M2 (LI et al., 2014)

EGF-R/p38/MAPK/Sp1/COX-2/VEGF: Embora esse mecanismo de ativação da expressão da COX-2 tenha sido visto no adenocarcinoma ductal pancreático, é possível que ocorra também em outros tipos de câncer, incluindo o cervical. Neste, por exemplo, observa-se a ativação da via do EGF-R/MAPK (DE FREITAS et al., 2017) e o aumento na expressão de Sp1 (DONG et al., 2017) que, quando inibida, causa redução da proliferação e invasão celulares. (HU et al., 2017)

De modo geral, a COX-2 está associada à promoção e ao estabelecimento do câncer devido sua ação pró-inflamatória, o que ocorre de maneira semelhante para o câncer cervical. A modulação positiva desta molécula está constantemente associada a situações clínicas adversas, o que correlaciona a presença desta enzima ou o aumento dos seus níveis ao mal prognóstico. Como exemplo, níveis elevados de sua expressão associam-se à ocorrência de metástase e à diminuição da taxa de sobrevida total (ST) (DE FREITAS et al., 2017; DIVVELA; CHALLA; TAGARAM, 2010).

Outras duas moléculas relacionadas a COX-2 também estão associadas ao desenvolvimento do câncer cervical e de outros tipos de tumores: são o NF-κB e a prostaglandina E2 (PGE₂). Estas duas moléculas de sinalização potencializam o efeito pró-carcinogênico da COX-2 sendo, por diversas vezes, o meio que a COX-2 desempenha suas funções e, por isso, também estão fortemente associadas ao prognóstico desfavorável. O primeiro é um fator de transcrição que está envolvido em inúmeras vias fisiológicas cujas desregulações levam a geração de patologias, entre elas o câncer. Este fator de transcrição está envolvido na expressão de genes envolvidos na sobrevivência celular, proliferação, angiogênese, inflamação, metástase, invasão, resposta imune, resistência a terapia etc (figura 16) (BAUD; KARIN, 2009; DE FREITAS et al., 2017; XIA; SHEN; VERMA, 2014).

A PGE₂ também desempenha vários efeitos pró-tumorigênicos, desde a indução da proliferação e migração celular, resistência à apoptose, angiogênese, invasão e metástase, a vários efeitos imunológicos/inflamatórios como a inibição da

maturação dos linfócitos T, da atividade das células NK e a indução da diferenciação dos macrófagos para o fenótipo M2 (DE FREITAS et al., 2017; DIVVELA; CHALLA; TAGARAM, 2010; LIU; QU; YAN, 2015). Mais informações sobre as atividades pró-carcinogênicas da COX-2 e da PGE₂ observadas tanto no câncer cervical quanto em outros tipos de tumor podem ser vistas na tabela 7.

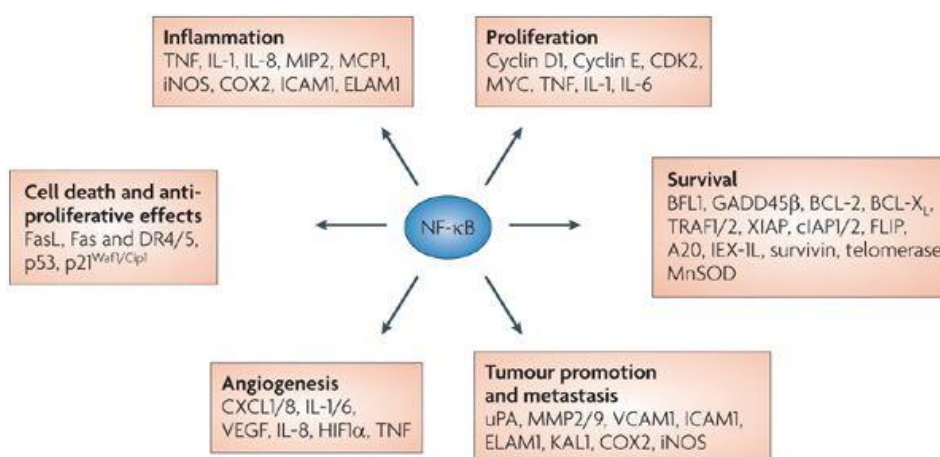


Figura 16. Genes alvos do NF-κB envolvidos no desenvolvimento e progressão do câncer.
Fonte: (BAUD; KARIN, 2009).

Tabela 7. Atividades e efeitos pró-carcinogênicos da COX-2 e PGE₂

TIPO DE CÂNCER	ATIVIDADES E EFEITOS DA COX-2/PGE ₂	REFERÊNCIA
Cervical	A COX-2, por meio da PGE ₂ e outras vias, foi correlacionada com diversos efeitos pró-carcinogênicos: imunossupressão, aumento do crescimento celular, metástase para os linfonodos, angiogênese, inibição da apoptose, resistência a quimioterapia, entre outros (mais detalhes e outros estudos podem ser vistos na seção 5.4.7).	(BARROS et al., 2018a; DE FREITAS et al., 2017; HUANG et al., 2013; SALES; KATZ, 2012)
Linhagens celulares de câncer	IL-17 induziu a expressão da COX-2 e da sua via de sinalização COX-2/PGE ₂ , o que	(LI et al., 2014)

cervical, pulmonar e prostático	resultou na indução da diferenciação para os macrófagos M2	
Mamário	A síntese de PGE ₂ pela atividade da COX-2 causa a inibição da apoptose devido a indução do aumento da BCL-2 e diminuição da BAX, que são anti e pró-apoptótico respectivamente. Além disso, em decorrência da atividade da COX-2/PGE ₂ ocorre: diminuição dos sinais do óxido nítrico, aumento da angiogênese (devido ao aumento do VEGF), aumento da invasividade (devido ao aumento de CD4), aumento do crescimento celular (via ativação do EGF-R), aumento na produção de metaloproteinases e indução da transformação celular (devido a síntese de mutagênicos pelo metabolismo do ácido araquidônico).	(DIVVELA; CHALLA; TAGARAM, 2010; HARRIS; CASTO; HARRIS, 2014)
Endometrial	A COX-2 levou ao aumento da expressão de VEGF e, conseqüentemente, à angiogênese.	(DIVVELA; CHALLA; TAGARAM, 2010)
Pulmonar	A síntese de PGE ₂ pela indução da expressão da COX-2 mediada por IL-1 leva a metástase de células de melanoma ao pulmão em modelo de camundongo. Outros estudos revelaram que o aumento nos níveis de COX-2 e PGE ₂ resultou em imunossupressão, desbalanço na síntese de citocinas, redução no processamento de antígenos pelas DCs e aumento do crescimento celular.	(DIVVELA; CHALLA; TAGARAM, 2010)

Gástrico	O aumento da COX-2, induzido pela bactéria <i>Helicobacter pylori</i> por meio da ativação da expressão do NF- κ B, provocou o aumento de VEGF.	(DIVVELA; CHALLA; TAGARAM, 2010)
Colorretal	Interfere no ciclo celular por meio do receptor EP ₄ e expressão alterada de p21WAF1/CIP1.	(DIVVELA; CHALLA; TAGARAM, 2010)
Prostático	COX-2 e PGE ₂ induzem o crescimento celular, ou por intermédio do PKC ou pela ação do PKA.	(DIVVELA; CHALLA; TAGARAM, 2010)
Linhagem FcγR P815 como modelo de câncer	Foi visto que a PGE ₂ inibiu a expressão dos principais receptores de ativação das células NK (NKG2D, CD16, NKp30, NKp44, NKp46) e, conseqüentemente, diminui sua atividade citotóxica.	(MARTINET et al., 2010)
Pancreático	A ativação da expressão da COX-2 por Sp1 mediada pela via do EGF-R/MAPK, causou angiogênese dependente de VEGF (foi impedida com a inibição da COX-2).	(HU et al., 2017)
Laríngeo	Observou-se que a COX-2 causou resistência à radioterapia	(DIVVELA; CHALLA; TAGARAM, 2010)

2.9.1 COX-2 e a terapêutica no câncer cervical

Devido ao papel central que a COX-2 desempenha na carcinogênese cervical, incluindo sua função exercida na resistência a terapia a este câncer (FERRANDINA et al., 2002), este marcador tem sido avaliado em sua terapêutica. Inibidores da COX-2 ou de seu principal produto PGE₂, ou ainda o uso de antagonistas dos receptores de prostaglandinas, têm sido frequentemente utilizados no tratamento de outros tipos

de tumores, como no de mama, pulmonar, colorretal, etc, devido aos múltiplos aspectos da carcinogênese em que a COX-2 contribui. Um exemplo foi o uso do anticorpo monoclonal anti-PGE₂ em modelo murino de carcinoma pulmonar, que resultou na diminuição da taxa de crescimento celular e aumento da sobrevida (DIVVELA; CHALLA; TAGARAM, 2010). A respeito do câncer cervical, pode-se citar alguns estudos, a partir dos quais pode-se concluir que o uso de inibidores da COX-2 não tem apresentado efeitos clínicos relevantes ou estatisticamente significantes quanto a regressão dos estágios de neoplasia de alto grau. Contudo, alguns efeitos anti-carcinogênicos podem ser observados. Descreve-se:

i. Celecoxib, inibidor seletivo da COX-2, causou a redução de marcadores da proliferação celular e angiogênese nas pacientes com câncer cervical (FERRANDINA et al., 2003);

ii. Em ensaio fase II para tratamento de câncer cervical localizado avançado, pacientes tratados simultaneamente com quimiorradiação e celecoxib não apresentaram nenhum acréscimo na taxa de resposta. No entanto, apresentaram efeitos cardiotóxicos e formação de fístulas (VICI et al., 2014).

iii. Utilizando a linhagem de câncer cervical HeLa, foi observado que o celecoxib causou o aprisionamento do ciclo celular e apoptose. Seus resultados foram comparados com a cisplatina, a droga utilizada como controle positivo do ensaio. Ambos desempenharam estes efeitos pela indução da expressão da p53 (SETIAWATI, 2016).

iv. Em ensaio estratificado randomizado duplo-cego fase II em pacientes com lesões em NIC III, o celecoxib não causou regressão do estágio histológico de modo significativo estatisticamente em relação ao grupo placebo, o que poderia estar relacionado com a posologia (400mg uma vez ao dia em vez de duas vezes). No entanto, houve significância estatística quando esta comparação foi feita considerando os altos níveis de VEGF sorológico das pacientes, havendo maiores taxas de regressão do grupo que recebeu a droga em relação ao grupo placebo. Portanto, o VEGF poderia ser considerado como fator predisponente para execução de tratamento personalizado, como o fato de prever o quanto a paciente pode se beneficiar a partir do uso do celecoxib (RADER et al., 2017).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PACIENTES E AMOSTRAS

Foram coletadas 171 biópsias de regiões de lesão cervical do colo uterino de pacientes do atendimento ambulatorio do Instituto de Medicina de Pernambuco Professor Fernando Figueira (IMIP) e do Hospital das Clínicas (HC - UFPE). Dentre estas 92 amostras (tabela 8) foram viáveis para realização dos ensaios de qPCR. As pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e está sob a identificação CAAE: 03606212.7.0000.5208.

Espécimes providos de regiões com alguma lesão indicativa de condição pré-neoplásica ou neoplásica foram coletadas e embebidas imediatamente em solução de *RNA/ater* (Qiagen) presente em tubo de 2,0 mL com tampa rosqueável. Essa solução é útil para conservar o RNA. Depois os tubos contendo as amostras de biópsias foram armazenados sob uma temperatura de -80°C até o procedimento de extração dos ácidos nucleicos. Mulheres infectadas pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana) ou grávidas foram excluídas do estudo.

As amostras então, foram classificadas de acordo com o estágio de lesão histopatológica. Os grupos controles foram dois, o normal, em que amostras sem alterações displásicas foram consideradas, independente de apresentarem infecção pelo HPV ou não; e o normal II onde as lesões sem alterações displásicas e sem infecção pelo HPV foram consideradas.

Tabela 8. Distribuição histopatológica e genotípica das amostras coletadas

AMOSTRAS	CLASSIFICAÇÃO	GENÓTIPO
105HC	NORMAL	HPV16
104HC	NORMAL	HPV58
02HC	NORMAL	SEM VÍRUS
04HC	NORMAL	HPV31
05HC	NORMAL	SEM VÍRUS
22HC	NORMAL	HPV58
32HC	NORMAL	HPV58

35HC	NORMAL	HPV31
43HC	NORMAL	HPV16
45HC	NORMAL	HPV58
74HC	NORMAL	HPV58
77HC	NORMAL	HPV58
08IM	NORMAL	SEM VÍRUS
21IM	NORMAL	SEM VÍRUS
24IM	NORMAL	SEM VÍRUS
43IM	NORMAL	HPV16
49IM	NORMAL	SEM VÍRUS
51IM	NORMAL	HPV16
86HC	NIC I	HPV16
51HC	NIC I	HPVs16, 31 e 58
54HC	NIC I	HPV31
63HC	NIC I	HPV58
59HC	NIC I	HPVs16, 31 e 58
46HC	NIC I	SEM VÍRUS
40HC	NIC I	HPVs16 e 58
37HC	NIC I	HPVs31 e 58
14HC	NIC I	HPV31
11HC	NIC I	HPVs16 e 31
03HC	NIC I	HPV16
27HC	NIC I	HPVs16 e 58
21HC	NIC I	HPVs16 e 31
19HC	NIC I	HPVs16 e 31
18IS	NIC I	HPV16
73HC	NIC I	HPVs16, 31 e 58
82HC	NIC I	HPV31
84HC	NIC I	HPV31
87HC	NIC I	HPVs31 e 33
04IM	NIC I	SEM VÍRUS
37IM	NIC I	HPV31
05IS	NIC II	HPVs16 e 31

16IS	NIC II	HPV31
17IS	NIC II	SEM VÍRUS
32IS	NIC II	HPV16
68HC	NIC II	HPVs58 e 18
69HC	NIC II	HPVs58 e 33
70HC	NIC II	HPVs16, 31 e 18
72HC	NIC II	SEM VÍRUS
06HC	NIC II	HPV31
15HC	NIC II	HPV16
76HC	NIC II	HPVs16 e 31
48HC	NIC II	HPVs16 e 31
79HC	NIC II	HPVs31 e 58
80HC	NIC II	SEM VÍRUS
92HC	NIC II	SEM VÍRUS
114HC	NIC II	SEM VÍRUS
14IM	NIC II	HPV16
26IM	NIC II	HPV31
28IM	NIC II	HPV16
32IM	NIC II	HPV45
06IS	NIC III	HPVs16 e 31
07IS	NIC III	SEM VÍRUS
13IS	NIC III	HPV31
19IS	NIC III	HPV31
25IS	NIC III	SEM VÍRUS
07HC	NIC III	HPV58
08HC	NIC III	HPV31
10HC	NIC III	HPV58
41HC	NIC III	HPV16
47HC	NIC III	HPV16
49HC	NIC III	HPVs16 e 58
78HC	NIC III	HPVs16, 31 e 58
29HC	NIC III	-
97HC	NIC III	HPV16

101HC	NIC III	HPVs16 e 58
98HC	NIC III	HPV16
99HC	NIC III	HPVs58 e 33
91HC	NIC III	HPVs31 e 58
115HC	NIC III	HPV31
06IM	NIC III	HPV31
18HC	CÂNCER	HPVs16 e 31
55HC	CÂNCER	HPV31
58HC	CÂNCER	HPVs16 e 31
67HC	CÂNCER	HPVs31 e 58
106HC	CÂNCER	HPV16
88HC	CÂNCER	SEM VÍRUS
95HC	CÂNCER	HPVs16 e 58
38HC	CÂNCER	HPVs16 e 31
25HC	CÂNCER	HPV16
100HC	CÂNCER	HPV16
103HC	CÂNCER	HPVs16 e 58
16IM	CÂNCER	HPV16
20IM	CÂNCER	SEM VÍRUS

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA E DETECÇÃO DO HPV

Para extração do DNA as biópsias (30 mg) foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas no *Trizol reagent* (Qiagen). Em seguida a suspensão foi homogeneizada em clorofórmio e centrifugada para formação de três frações: a superior contém o DNA, a intermediária o RNA e a inferior as proteínas. Sendo assim as frações foram recuperadas por pipetagem para execução dos respectivos procedimentos de purificação. A purificação do DNA foi executada por meio do *DNeasy Blood and Tissue kit* (Qiagen).

A detecção do HPV nas amostras de DNA foi feita por meio da realização da PCR com o par de *primers* My09/11.

3.3 GENOTIPAGEM E PRIMERS

A genotipagem foi realizada por meio de PCRs com *primers* específicos para cada tipo viral (HPV16, 31, 58, 18 e 33). Esses *primers* (tabela 9) foram desenhados por meio do software *CLCbio Main Workbench 5.7.1 version* ou do *Primer3*, e foram utilizados para avaliação da expressão gênica após terem sido testados sua temperatura de anelamento ótima (Ta), suas eficiências e validados.

Tabela 9. Relação de *primers* utilizados para genotipagem e qPCRs

		Ta e	
PAR	SEQUÊNCIA	COMPRIMENTO DO AMPLICON	
HPV16	E5 F 5'- ACT GGC GTG CTT TTT GCT TTG -3'	60°C / 78 pb	
	E5R 5'- GAC ACA GAC AAA AGC AGC GG -3'		
	49 F 5'- TGC AAT GTT TCA GGA CCC -3'	57,7°C / 51 pb	
	49 R 5'-CAT AAC TGT GGT AAC TTT CTG GG3'		
HPV31	41 F 5'- GCT GTC TGT GTC GGT ATA T -3'	53,7°C / 82 pb	
	41 R 5'- AAA ACA ACG TAA TGG AGA GG -3'		
	34 F 5'- ACC GTT GTG TCC AGA AGA AA -3'	55,8°C / 84 pb	
	34 R 5'- CAA CGT CCT GTC CAC CTT C -3'		
	44 F 5'- ACA GAG CAC ACA AGT AGA -3'	55,7°C / 82 pb	
	44 R 5'- AGT AGA ACA GTT GGG GCA -3'		
HPV58	20 F 5'- GGG TCG GCT CTA CGA ATT TT -3'	60°C / 94 pb	
	20 R 5'- CTT GTT GGG TTA AGT ATT GTG C3'		
	21 F 5'- ATG TTC CAG GAC GCA GAG G -3'	60°C / 77 pb	
	21 R 5'- ATT TCA TGC ACA GAT GTC TCC -3'		
	22 F 5'- AAA CAA CCC AAC GCT AAG AGA -3'	60°C / 116 pb	
	22 R 5'- GCC CGT CCA AGC CTA TTT C -3'		
HPV18	13 F 5'- CGC TTT TGC CAT CTG TCT GT -3'	58°C / 54 pb	
	13 R 5'- ACA CAA ATA CCA ATA CCC ATG C3'		
	17 F 5'- ATT AAT AAG GTG CCT GCG GTG -3'	52,5°C / 114 pb	
	17 R 5'- TGG CAC TGG CCT CTA TAG T -3'		

	18 F	5'- AGC GAC TCA GAG GAA GAA AAC 3'	58°C / 97 pb
	18 R	5'- CTG GCT TCA CAC TTA CAA CAC -3'	
HPV33	1 F	5'- CTA TGC TTG GTT GCT GGT GT -3'	61°C / 53 pb
	1 R	5'- GAG ATC CCA CAA ACA CCC AAA -3'	
	4 F	5'- TAT TTC GGG TCG TTG GGC A -3'	58°C / 64 pb
	4 R	5'- TGC AGT TTC TCT ACG TCG G -3'	
	5 F	5'- ACA CAA GCC AAC GTT AAA GGA -3'	61°C / 107 pb
	5 R	5'- CCA AGC CTT CAT CCT CAT CT -3'	

3.4 PURIFICAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA

Para a purificação do RNA a fração anteriormente separada dos outros componentes (DNA e proteínas) foi submetida ao *miRNeasy kit* (Qiagen).

Para avaliação da integridade do RNA uma corrida eletroforética configurada para utilização de RNA foi realizada e as amostras foram quantificadas pelo *Nanodrop spectrophotometer* (ThermoScientific Wilmington, USA). Em seguida 1 µg das amostras de RNA foram submetidas à transcrição reversa por meio do *miScript II RT kit* (Qiagen).

3.5 PCR QUANTITATIVA (QPCR)

A qPCR foi realizada para os alvos citados anteriormente com os primers citados no item 5.3. Foram utilizados os genes endógenos (ou de referência) GAPDH e ACTB para geração do fator de normalização e dos valores de quantificação relativa para todos os alvos avaliados. Para determinação da eficiência dos pares de *primers* utilizados foi realizado uma curva padrão onde uma amostra teste cDNA do banco de amostras foi diluída de forma seriada na proporção de 10x.

Para execução da qPCR foi utilizado o Quantitect Sybr green PCR kit (Qiagen) ou Syber green Master mix kit (Promega). A reação ocorreu no termociclador Rotor Gene 6000 (Qiagen, Hilden, Germany) e cada amostra foi feita em duplicata. Uma amostra calibradora foi mantida entre todas as corridas a fim de evitar as alterações entre as corridas. Os valores do limiar comparativo (Ct) serão convertidos a uma razão

com relação ao controle e genes de referência e os dados de quantificação relativa serão gerados de acordo o modelo *qBase* (HELLEMANS et al., 2007) para análise dos dados de expressão.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Realizou-se por meio dos softwares *GraphPad Prism* (versão 5.0) e do *Stata/SE* (versão 12.0). O teste D'Agostino-Pearson foi feito a fim de determinar se os dados estavam organizados sob a distribuição de Gauss. O teste de Kruskal-Wallis foi executado com o objetivo de comparar os níveis de expressão em todos os estágios de desenvolvimento do câncer simultaneamente, enquanto o teste de Mann-Whitney-Wilcoxon foi realizado a fim de comparar dois grupos entre si por vez. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETECÇÃO VIRAL

O DNA das biópsias foi extraído e utilizado para realização de ensaios de PCR utilizando o par de *primers* My09/11 para detecção da presença do papilomavírus nas amostras. Esse par de *primers* amplifica uma sequência específica para o HPV.

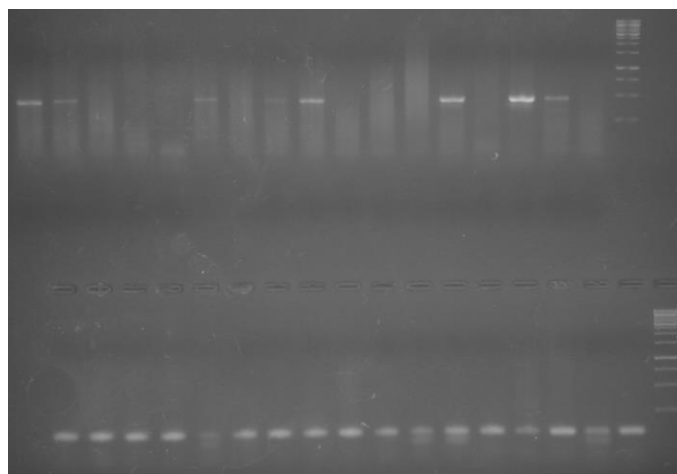


Figura 17. Corrida eletroforética de produtos da PCR do par de *primers* My09/11 (primeira fileira) e da β -actina (segunda fileira). O tamanho do produto de PCR do par My09/11 é em torno de 300pb enquanto da β -actina é em torno de 125pb. A corrida ocorreu durante 30 minutos em 80V em gel com 2% de agarose.

4.2 GENOTIPAGEM

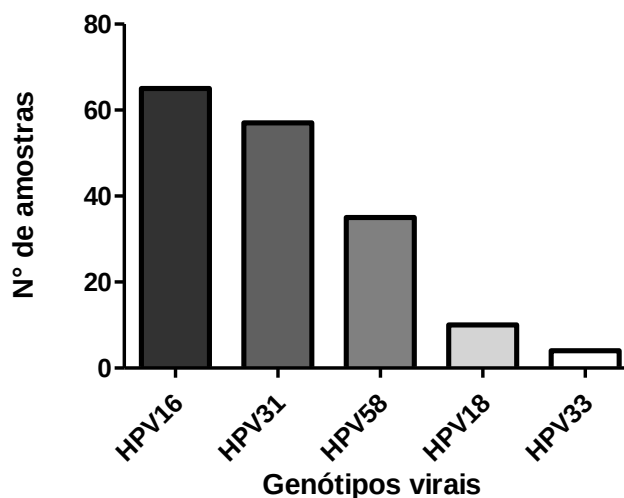


Figura 18. Genotipagem das amostras. Entre as amostras que apresentaram um genótipo e as que exibiram coexistência de dois ou três, observou-se 65 amostras positivas para o HPV16, 57 para o HPV31, 35 para o HPV58, 10 para o HPV18 e 4 para o HPV33.

4.3 EXPRESSÃO DO ONCOGENE E5 DOS GENÓTIPOS 16, 31, 58

Foram avaliados os perfis de expressão do oncogene E5 dos genótipos 16, 31 e 58. Para os genótipos 33 e 18 não houveram amostras suficientes viáveis para realização de uma análise.

4.3.1 Expressão do oncogene E5 do HPV 16

O perfil de expressão do mRNA do oncogene E5 do HPV 16 foi analisado nas amostras cervicais das pacientes. Os resultados demonstram que houve um aumento na expressão de E5 em todos os níveis de lesão cervical. Entretanto, valores estatísticos só foram observados entre os grupos NIC I e NIC III em relação ao controle, grupo normal (figura 19). Observa-se também que a expressão de E5 foi sutilmente maior nos estágios de alto grau e câncer (invasão).

Na literatura, é comumente encontrado e sugerido que a expressão de E5 é maior nos estágios de menor grau pré-neoplásico do que em estágios de maior grau ou no próprio carcinoma. Isto se deve a presença da integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro, pois este evento causa a perda do oncogene E5 e, portanto,

este oncogene atuaria no estágios iniciais da carcinogênese cervical (DIMAIO; MATTOON, 2001; LORENZON et al., 2011; NAGAO et al., 2002).

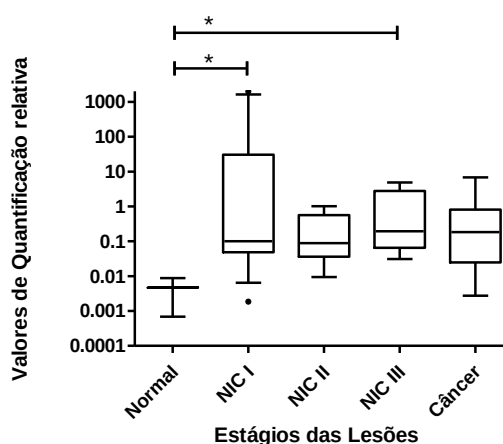


Figura 19. Níveis de expressão do oncogene E5 (HPV16). Lesões de NIC I, NIC II, NIC III, câncer comparadas entre si e entre o grupo normal (amostras que não apresentam alterações displásicas).

No entanto, a expressão de E5 também foi encontrada no câncer e nos estágios de maior grau pré-neoplásico (CHEN et al., 2014; HÄFNER et al., 2008; SAHAB et al., 2012; SHIRASAWA et al., 1988), como foi observado em nossas amostras. Hafner et al. (2008), por exemplo, encontrou altos níveis do transcrito de E5 em poucas amostras de carcinoma e concluiu que a expressão de E5 não estava correlacionado com o estágio histológico da lesão, mas apenas com o status físico do vírus – se episomal ou integrado (HÄFNER et al., 2008). Chang et al. (2001), por sua vez, avaliou a expressão de E5 por imuno-histoquímica e verificou a presença dessa oncoproteína além de nas lesões de baixo grau, também nas de alto grau e câncer. Eles relacionaram a expressão de E5 encontrada nos estágios de alto grau e câncer ao HPV episomal, e concluíram que E5 não pode ser utilizado como marcador da transição da condição benigna para maligna (CHANG et al., 2001).

Algumas hipóteses têm sido criadas para explicar estes resultados opostos, apesar deste tema ainda ser controverso. Aqueles que encontram baixa expressão de E5 no estágio de alto grau e carcinoma baseiam-se na hipótese da perda física do oncogene E5 após a integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro, juntamente com a perda de E2. Outros pesquisadores, como descrito por Chang et al. (2001), defendem a ideia que formas episomais do vírus também estão presentes no estágio de alto grau e carcinoma e são responsáveis pela expressão do oncogene E5.

De acordo com os nossos achados, pode-se sugerir que é possível que o E5 contribua para a carcinogênese cervical também nos estágios mais tardios. Como na

amostra existem um conjunto amplo de células, é possível que em um mesmo estágio, seja ele de alto grau ou carcinoma, coexistam populações celulares com graus menos e mais avançados de malignidade. Dessa maneira, populações em estágios onde a malignidade é mais evidente pode contribuir de forma parácrina para a carcinogênese de populações celulares vizinhas em estágios mais iniciais de malignidade, onde o genoma viral ainda não tenha se integrado. Sabe-se que inúmeros outros fatores contribuem para a carcinogênese cervical e este não depende somente da influência dos oncogenes virais próprios das células infectadas. Os oncogenes agem de forma extracelular, por meio da secreção de fatores imunológicos e de moléculas de sinalização que viabilizam as ações das células estromais e da resposta inflamatória, como os macrófagos, neutrófilos e mastócitos. Portanto, é possível que o tumor contenha células com diferentes status físico do HPV e que estas células interajam entre si e com outras no microambiente tumoral de modo a estabelecer um padrão maligno em todas as camadas do tecido cervical. A figura 20 mostra a influência de uma célula que expressa E5 sobre outra por meio da indução da secreção IFN- β e exemplifica essa hipótese. Outra possibilidade ainda é que a coexistência de vírus com diferentes status físico ocorra em uma mesma célula e que possam contribuir conjuntamente para a transformação celular.

Ainda existe outra linha que relata a detecção de E5 em células que contém exclusivamente o genoma viral integrado (SAHAB et al., 2012), o que pode explicar os altos níveis de expressão observados em Hafner et al. (2008), Chen et al. (2014) e no nosso estudo. Estudos prévios que motivaram Sahab et al. (2012) têm observados o transcrito de E5 em células com o genoma viral integrado. Parece que nem sempre o oncogene E5 é perdido em seguida a integração viral ao genoma do hospedeiro e que outros *hot spots* do genoma viral podem representar importantes sítios frágeis para quebra gênica.

Variações entre os resultados também podem decorrer de outras razões como os diferentes modelos experimentais utilizados. O reduzido número de amostras dos modelos *in vivo* e as próprias diferenças entre os modelos, como o *in vitro* vs *in vivo*, o método utilizado para mensuração da expressão quantitativa relativa ou ainda o padrão de controle utilizado. Além disso, variações entre e dentro das populações e entre pacientes (diferenças clínicas e biológicas) também podem confundir a interpretação dos dados.

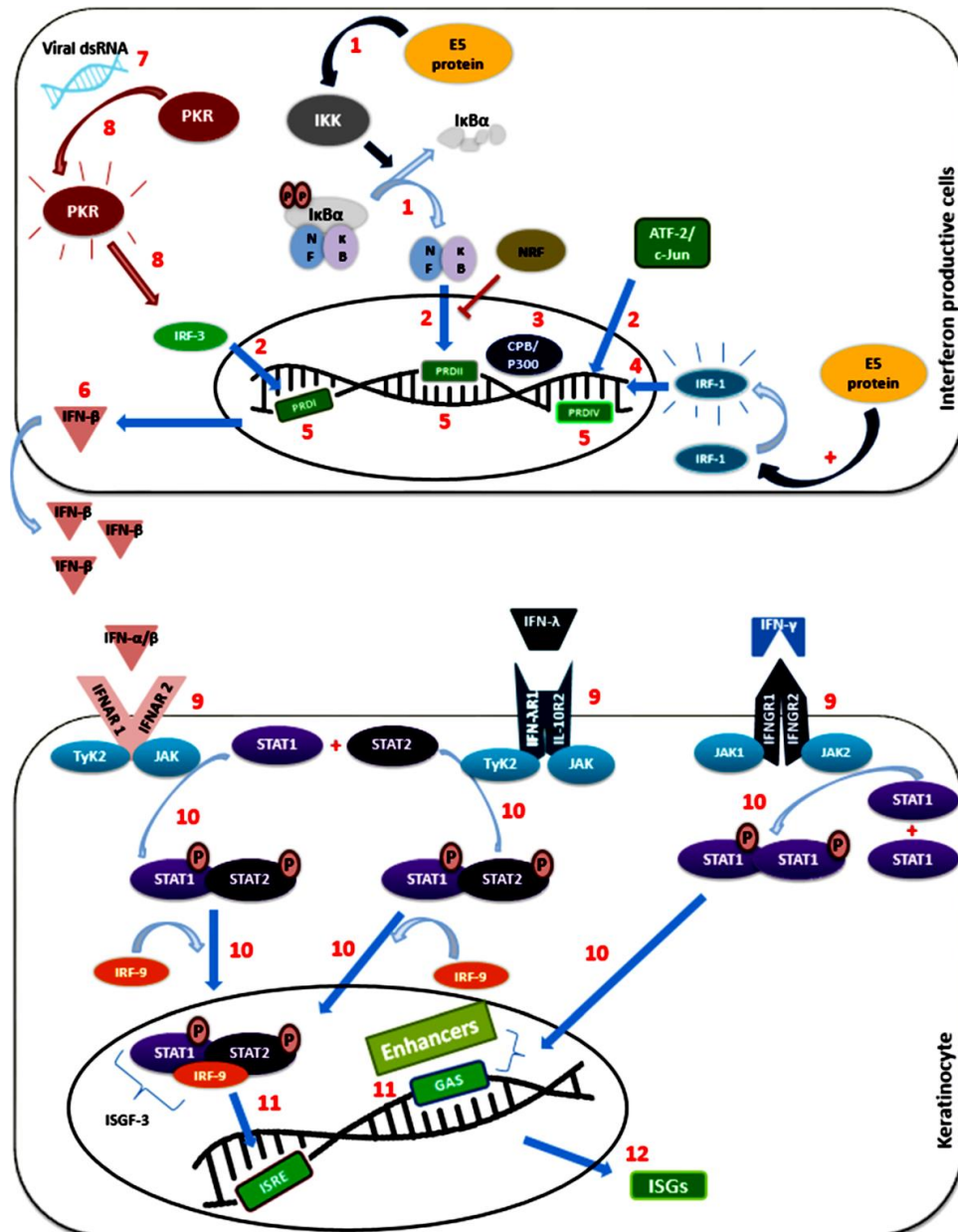


Figura 20. Síntese de interferência e vias de sinalização. A oncoproteína E5 induz a síntese de IFN por meio da ativação da via de sinalização do NF-κB e da proteína IRF-1. O IFN secretado então, pode agir sobre células vizinhas modificando sua expressão gênica. (1) PRR / MAVS (sinalização antiviral mitocondrial) ativa a IKK que libera o NF-κB. (2) O NF-κB, o IRF-3 e o ATF-2 / c-Jun formam um complexo de transcrição que recruta o (3) *enhancer* da CPB / P300 para o promotor do IFN-β. (4). Este complexo (juntamente com o IRF-1) liga-se a (5) regiões particulares do DNA (PRDI, PRDII e PRDIV) que resultam na (6) transcrição gênica do IFN-β. De modo independente de IFN, (7) dsRNA viral induz (8) a sinalização de PKR-IRF3. Os IFNs produzidos exercem suas atividades nos queratinócitos por meio da (9) interação com receptores específicos do tipo IFN e (10) desencadeando as vias de sinalização JAK/STAT. IFN-α, IFN-β e IFN-λ interagem com receptores associados a tirosina quinases JAK1 e Tyk2 que induzem a ativação e a formação de dímeros do fator transcrional STAT1/STAT2 por fosforilação. Este dímero forma um complexo com o fator estimulador gênico de IFN-3γ (ISGF-3γ), também chamado fator regulador do IFN-9 (IRF-9) ou P48, que se liga à sequência ISRE do DNA. Por sua vez, o IFN-γ liga-se a receptores associados às tirosina quinases Jak1 e Jak2 que induzem a formação do homodímero STAT1/STAT1. Finalmente, (11) a ligação de fatores de transcrição a elementos responsivos específicos (ou seja, ISRE e GAS) de DNA leva à expressão de (12) ISGs.

Fonte: (DE FREITAS et al., 2017).

4.3.2 Expressão do oncogene E5 do HPV 31

O perfil de expressão do RNAm oncogene E5 do HPV31 foi avaliado e nenhuma comparação apresentou valores de p estatisticamente significantes (figura 21). Pode-se observar, contudo, que existe um padrão semelhante ao apresentado pelo E5 do genótipo 16, isto é, a expressão desse oncogene aumenta de acordo com o grau de malignidade histológico. Assim como o E5 do HPV16, o E5 do HPV31 também tem funções anti-imunológicas (interage com a cadeia pesada do MHC I, comprometendo a apresentação de antígenos) que contribuem para a imunoevasão viral e, conseqüentemente, para a carcinogênese (VENUTI et al., 2011). Além disso, este oncogene é importante para a completa expressão do genoma viral e formação de colônias (DIMAIO; PETTI, 2013). Embora o E5 do HPV31 tenha sido pouco avaliado, infere-se que muitas de suas atividades sejam semelhantes ao E5 do HPV16, mesmo porque ambos possuem a mesma variante gênica (E5 α).

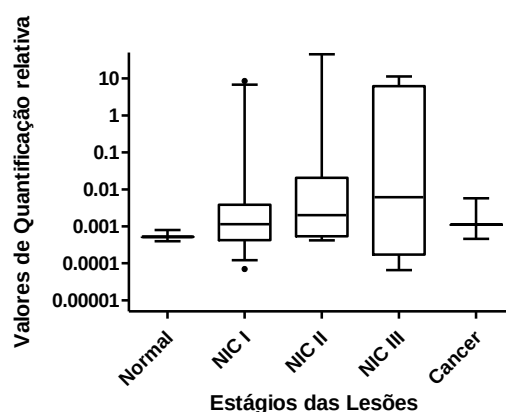


Figura 21. Níveis de expressão do oncogene E5 (HPV31). Lesões de NIC I, NIC II, NIC III, câncer comparadas entre si e entre o grupo normal.

4.3.3 Expressão do E5 do HPV 58

O perfil de expressão do RNAm do E5 do genótipo 58 não mostrou nenhum valor de p significativo entre os estágios pré-neoplásicos (figura 22). Houve um n reduzido de amostras, o que influenciou na possível significância estatística. É importante notar que o grupo sem lesão demonstrou um padrão de expressão mais elevado que os demais, diferentemente do que ocorreu para os dois genótipos anteriores, o 16 e o 31. Isso sugere que a oncogenicidade do E5 (HPV58) deve ser menor que os dos outros dois genótipos. De fato a frequência de casos de câncer

cervical é mais frequente em pacientes infectadas pelo HPV16, semelhantemente ao que ocorre no nordeste brasileiro e no estado de Pernambuco (GURGEL et al., 2015). Assim como ocorre para o E5 do HPV31, o E5 do HPV58 também não é muito frequente em estudos sobre câncer cervical.

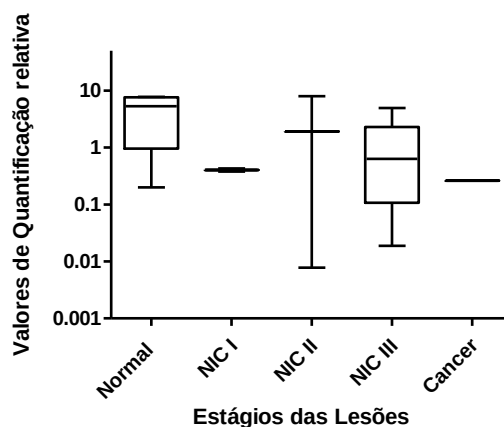


Figura 22. Níveis de expressão do oncogene E5 (HPV58). (A) Lesões de NIC I, NIC II, NIC III, câncer comparadas entre si e entre o grupo normal.

4.3.4 Expressão do E5 dos genótipos estudados

O perfil de expressão do oncogene E5 (figura 23) foi avaliado todas as amostras que apresentaram pelo menos um dos três genótipos (16, 31 ou 58). Para as amostras que continham mais de um ou os três, foi considerado o maior valor de quantificação relativa. Pode-se perceber que o oncogene E5 continua a ser mais expresso no estágio NIC III. Já quando comparados os outros estágios histológicos os níveis de expressão foram semelhantes entre si.

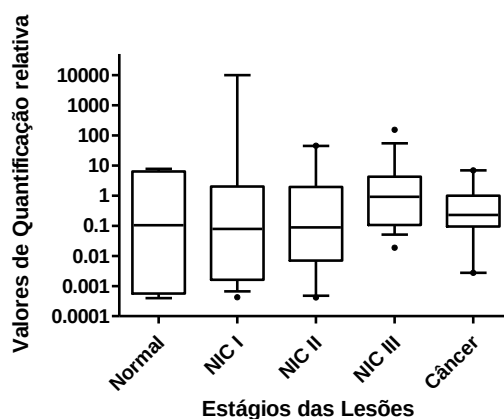


Figura 23. Níveis de expressão do oncogenes E5. Lesões de NIC I, NIC II, NIC III, câncer comparadas entre si e entre o grupo normal.

4.4 EXPRESSÃO DA CAVEOLINA-1

Nos dados gerados observados nos gráficos da figura 24 a seguir, foi visto que a expressão do RNAm da cav-1 em lesões cervicais foi maior no estágio de NIC I em relação aos estágios posteriores (NIC II, III e Câncer), sendo $p=0,0314$ (NIC I x NIC II), $p=0,05$ (NIC I x NIC III), $p=0,0268$ (NIC I x Câncer). Quando o grupo normal (amostras que não apresentaram quaisquer anormalidades no resultado histopatológico) foi considerado em seu conjunto total de amostras, ou seja, independentemente de serem detectados HPV, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados aos outros grupos. Quando foi considerado o grupo normal II (amostras sem anormalidades e sem detecção de qualquer dos hrHPVs avaliados) foi visto diferença estatística significativa entre este grupo e o NIC I ($p=0,0029$) e o NIC III ($p=0,0176$).

Ainda foi observado que, quando as amostras foram submetidas ao sistema Bethesda de classificação e considerando o grupo normal II, o teste de Kruskal-Wallis resultou em valor de p significativo ($p=0,0062$). Quando aplicado o teste de Mann-Whitney, foi visto diferença estatisticamente significativa entre os grupos: Normal II x baixo grau ($p=0,0029$), normal II x alto grau ($p=0,039$), baixo grau x alto grau ($p=0,0168$) e baixo grau x câncer ($p=0,0268$).

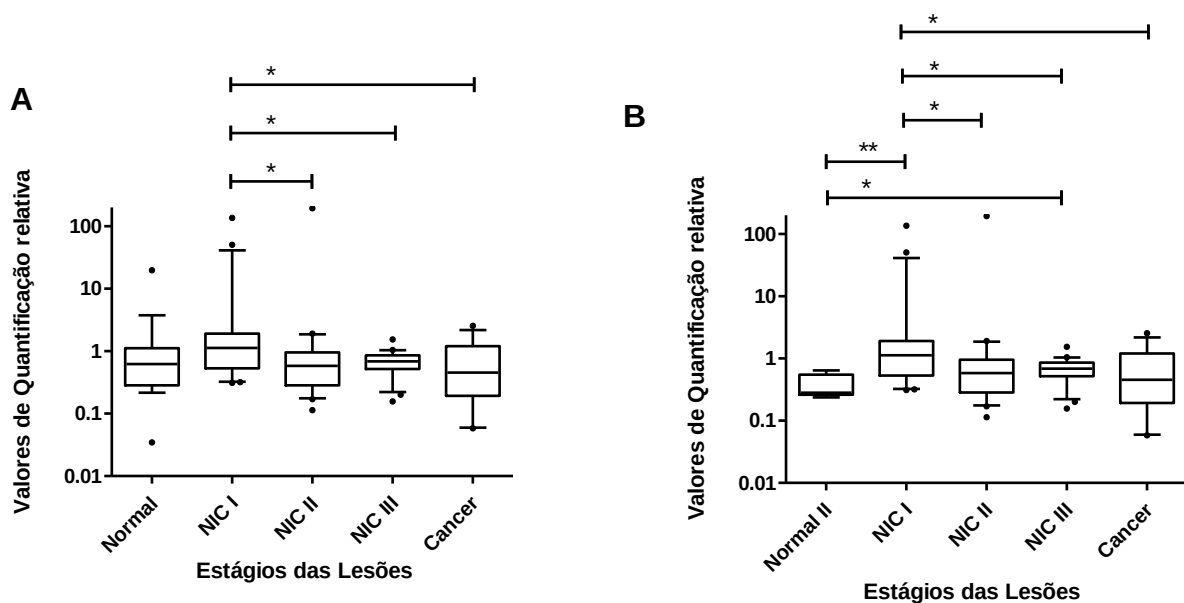


Figura 24. Níveis de expressão da caveolina-1. Lesões de NIC I, NIC II, NIC III, câncer comparadas entre si, entre o grupo normal (A) e normal II (B).

Como descrito anteriormente, a caveolina-1 é uma proteína que faz parte do complexo caveolae. Esta proteína contribui para a entrada do HPV no queratinócito e modula inúmeras vias de transdução de sinal, entre elas, aquelas envolvidas em processos carcinogênicos, como as que regulam o crescimento celular, apoptose e a resposta imune.

É reportado na literatura científica que esta proteína funciona como um importante supressor tumoral. Em modelos de câncer, foi visto que a cav-1 inibe o crescimento celular por aprisionamento na fase G₀/G₁ por mecanismo dependente de p53 (GALBIATI et al., 2001). A respeito do câncer cervical, seus níveis foram encontrados baixos em várias linhagens desse tipo de câncer (RAZANI et al., 2000).

Foi visto nesse estudo que a expressão desta proteína foi maior durante o estágio de NIC I, caracterizado por células ainda não transformadas, o que poderia representar um sucesso da cav-1 em conter a progressão neoplásica no tecido cervical. Quanto aos estágios mais avançados e de carcinoma, os níveis de RNAm são relativamente menores, de acordo com que é reportado na literatura comumente, o qual relaciona a cav-1 a supressão tumoral, conforme visto na seção 2.5.2.

Foi demonstrado que a cav-1 inibe a carcinogênese de diversas maneiras, principalmente por bloquear a atividade de proteínas quinases relacionadas a mitogênese, migração e invasão celulares e crescimento independente de ancoragem. Proteínas como a EGF-R, PDGFR e vias de sinalização como a Ras-p42/44 MAPK e da PI3K sofrem a interferência da cav-1 (BOURAS; LISANTI; PESTELL, 2004; COUET; SARGIACOMO; LISANTI, 1997; ENGELMAN et al., 1998a; GALBIATI et al., 1998). Sendo estas vias também envolvidas na resposta imune, é sugerido que a cav-1 também contribua para o interrompimento da carcinogênese dessa maneira. Por exemplo, sabe-se que a cascata da PIK3 é utilizada pelo TGF- β para cumprimento de seus efeitos imunomodulatórios (DE FREITAS et al., 2017). Sendo a cav-1 um inibidor da PI3K, poderia assim contribuir para o impedimento da imunoevasão viral.

Em fibroblastos dermais humanos, foi visto que a cav-1 funcionou como regulador positivo da via de sinalização TGF β /Alk1/Smad1 (HAINES et al., 2012), assim como em outros tipos celulares (MEYER et al., 2011; SANTIBANEZ et al., 2008) e ainda não avaliado nos queratinócitos cervicais. Sendo esta via importante na carcinogênese cervical e onde o E5 também demonstra regulação (DE FREITAS et al., 2017), a cav-1 pode modular a progressão do câncer pela modulação da ativação

desta via. Foi visto que quando os níveis da cav-1 estavam diminuídos nas células estromais maiores eram as chances de ocorrência do câncer. A ausência da expressão dessa proteína tem-se revelado um poderoso biomarcador que prediz a recorrência precoce do tumor, metástase e prognóstico desfavorável em outros cânceres (WITKIEWICZ et al., 2009), o que ocorrer de forma semelhante no cervical.

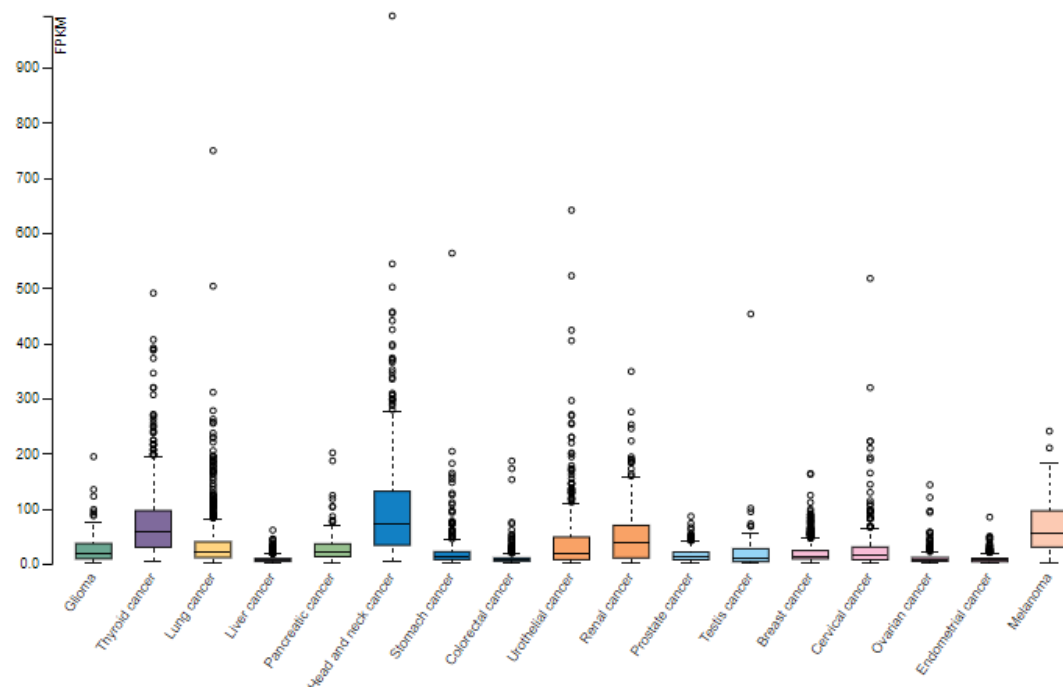


Figura 25. Padrão de expressão gênica da cav-1 na literatura. Os cânceres de cabeça e pescoço, tireoide e o melanoma são os tipos tumorais que apresentam os maiores valores de expressão do RNAm da cav-1. Quanto ao câncer cervical, os valores foram menos expressivos, embora com alguns resultados bem discrepantes. O maior valor de FPKM foi de 517,3 enquanto o menor foi de 0,5. A mediana foi em 15,7 e o intervalo de confiança ficou entre 30,7 e 7,6. Fonte: ("Expression of CAV1 in cancer", [s.d.]).

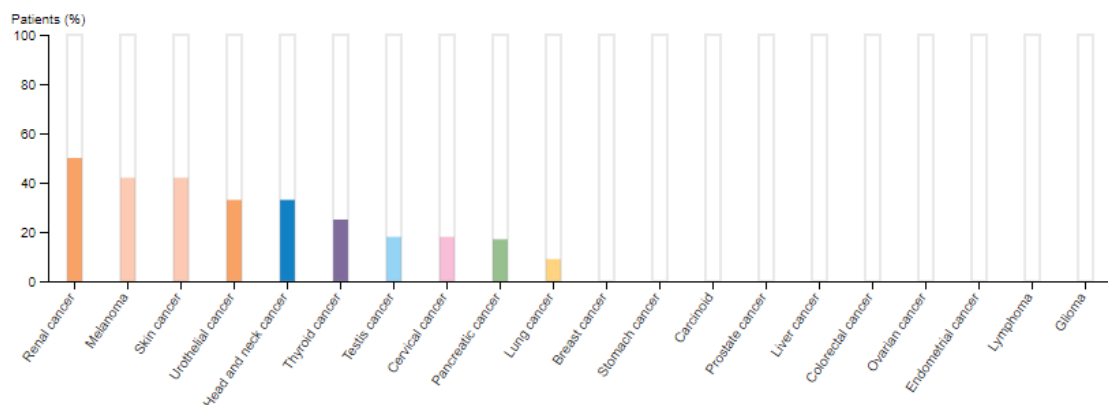


Figura 26. Padrão de expressão proteica da cav-1 na literatura. Comumente os tecidos apresentaram de fraca a moderada coloração no citoplasma e nas regiões de membrana. O câncer renal foi o tipo tumoral que apresentou níveis maiores da cav-1 seguido do melanoma. Em relação ao cervical os níveis foram baixos. Muitos tipos de tumor não apresentaram positividade alguma para esta proteína. Fonte: ("Expression of CAV1 in cancer", [s.d.]).

4.5 EXPRESSÃO DA GANGLIOSÍDEO SINTASE (PAR GM1_4)

O perfil de expressão do RNAm da gangliosídeo sintase (beta-1,3-galactosiltransferase 4) pode ser visto na figura 27. Não foi observado nenhum resultado estatisticamente significativo para nenhuma das comparações realizadas, mesmo quando considerado o grupo normal II, havendo uma manutenção dos níveis de expressão gênica entre os grupos avaliados.

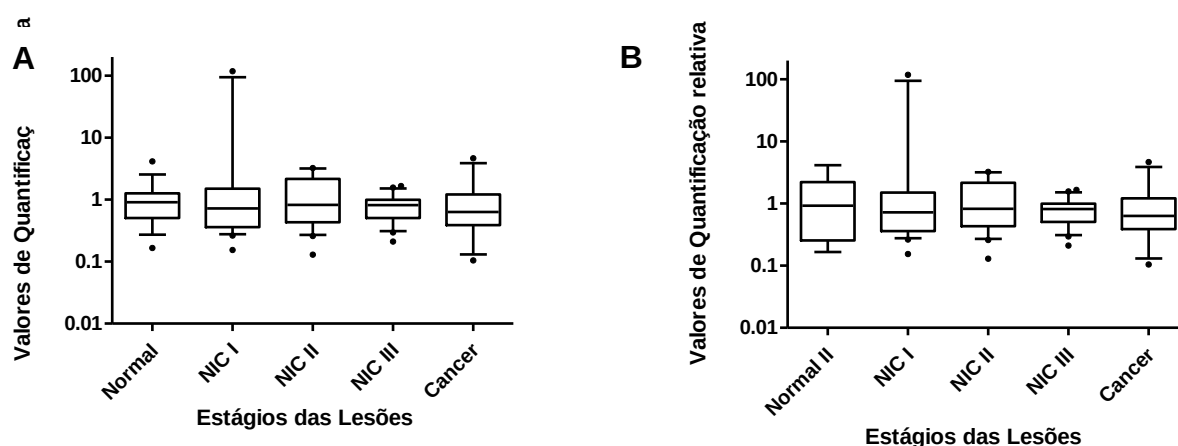


Figura 27. Níveis de expressão da gangliosídeo sintase-1. Lesões de NIC I, NIC II, NIC III, câncer comparadas entre si, entre o grupo normal (A) e normal II (B).

Os gangliosídeos são glicoesfingolipídios constituintes da membrana plasmática e do complexo caveolae e estão envolvidos em diversas atividades biológicas. Por esta razão, a desregulação em seus níveis se relaciona com várias condições patológicas, entre elas o câncer (GROUX-DEGROOTE et al., 2018).

Poucos estudos avaliaram o GM1 no câncer, especialmente no cervical. Estudos sobre outros gangliosídeos em cânceres de mama e ovário são mais frequentes, sendo observado tanto efeitos pró-carcinogênicos quanto anti-carcinogênicos. Estes estudos podem servir de base para a execução de estudos em câncer cervical já que suas atividades podem ser inferidas neste outro tipo de câncer ginecológico. Por exemplo, foi visto no câncer de ovário que o aumento nos níveis da GM3 sintase, uma enzima situada mais inicialmente na via de síntese do GM1. Portanto, o aumento em seus níveis pode presumir níveis aumentados deste e outros

glicoesfingolipídios que contribuem conjuntamente, desta maneira, para os efeitos observados como a redução da motilidade celular (PRINETTI et al., 2010).

Em relação ao câncer de mama foi visto níveis elevados de GD3 e GT3 no carcinoma ductal (ZHUO; LI; GUAN, 2018). O aumento da GD3 e GD2 sintase e a ST6GALNAC5 também foram correlacionados à carcinogenicidade (DEWALD et al., 2018; ZHUO; LI; GUAN, 2018) (SARKAR et al., 2015). Já o aumento da GD1b apresentou efeito anti-carcinogênico pois induziu a apoptose da linhagem MCF-7 de câncer de mama (ZHUO; LI; GUAN, 2018). As figuras 28 e 29 a seguir demonstram o padrão de expressão gênica (por meio do RNAseq) e proteica (por imunohistoquímica) da GM1 sintase em vários tipos de câncer.

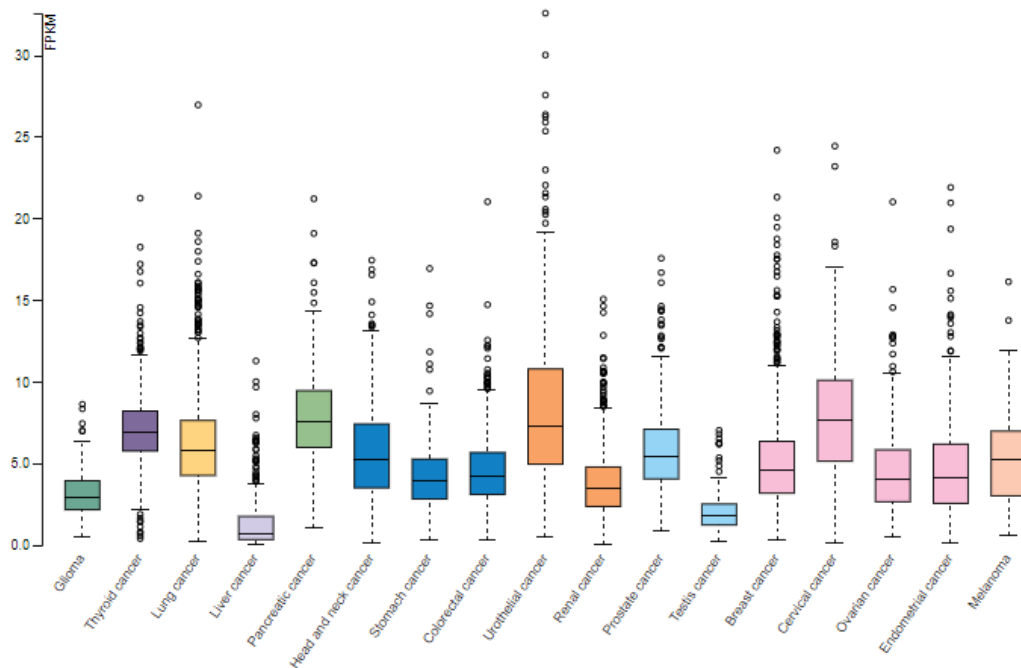


Figura 28. Padrão de expressão gênica da GM1 sintase na literatura. Os cânceres cervical, urotelial e pancreáticos apresentaram as maiores medianas enquanto os cânceres de testículo, fígado e glioma apresentaram as menores. O nível de expressão gênica está mensurado em FPKM, ou seja, no número de fragmentos por kilobase de exon por um milhão de leituras. A paciente de maior valor de FPKM foi 24,4 e a de menor foi 0,2. A mediana foi em 7,7 no intervalo de confiança entre 5,2 e 10,1 o que indica que, embora tenha ocorrido casos em que a expressão mostrou-se muito elevado, a maioria das pacientes possuíam níveis menores de expressão.

Fonte: ("Expression of B3GALT4 in cancer", [s.d.]).

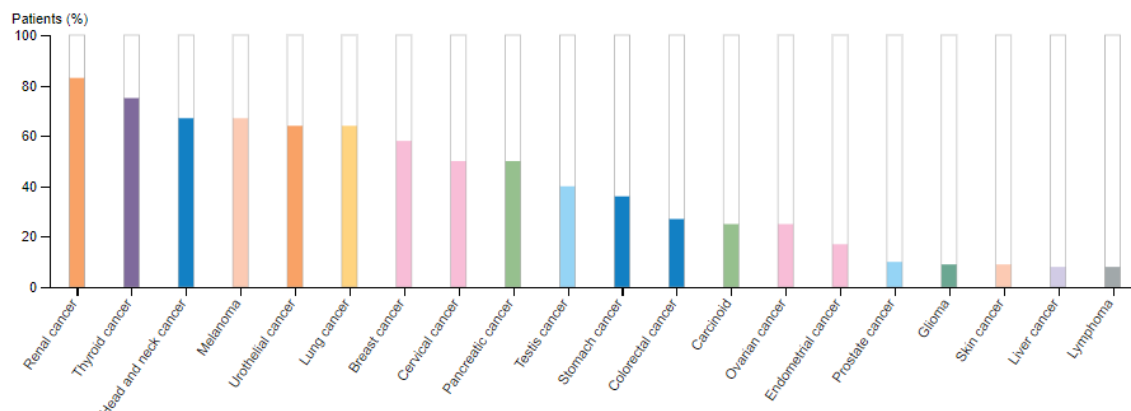


Figura 29. Padrão de expressão proteica da GM1 sintase na literatura. Os tecidos apresentaram de fraca a moderada coloração no citoplasma e na membrana plasmática. O adenocarcinoma papilar da tireoide com alguns casos de melanoma apresentaram intensa imunorreatividade. Alguns casos de glioma, linfomas, fígado, próstata e câncer de pele foram negativos. A maioria dos casos de câncer cervical apresentaram nível de coloração moderado, seguido de baixo detecção e não detectado. Nenhum caso de nível alto de coloração foi observado.

Fonte: ("Expression of B3GALT4 in cancer", [s.d.]).

A respeito do câncer cervical, o GM1 foi avaliado poucas vezes. Seko et al. (2009) identificou níveis elevados da GM1 sintase no soro de pacientes com câncer cervical ou outros cânceres ginecológicos, como o câncer de corpo uterino e vários tipos de câncer de ovário. Também foi visto níveis elevados desse marcador em linhagens celulares relacionadas aos tipos específicos de cada câncer. Para os cânceres de ovários, os níveis sorológicos de GM1 sintase foram comparáveis ao de CA125 para diagnóstico. No caso do câncer cervical foi visto uma positividade em 47% dos casos (SEKO et al., 2009).

No estudo de Suprynowicz et al. (2008), foi visto que o GM1 estava acentuadamente aumentado na membrana plasmática de células ectocervicais humanas. Esse aumento foi associado ao oncogene E5. Contudo não foi visto padrões de expressão gênica diferentes da GM1 sintase de acordo com os estágios de progressão neoplásica (SUPRYNOWICZ et al., 2008).

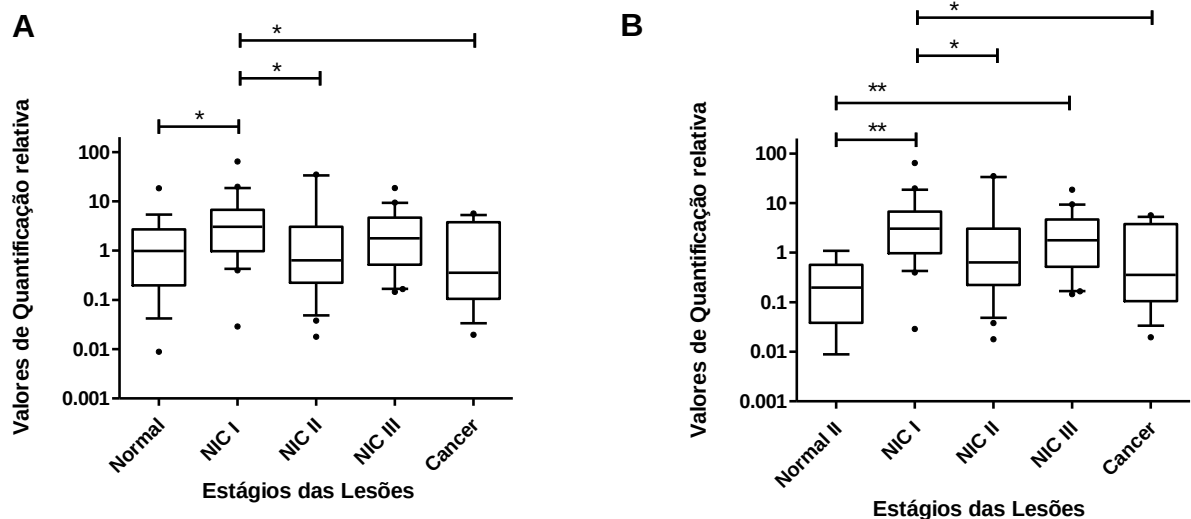
Desse modo, verifica-se que a frequência de detecção desta proteína não é tão evidente no carcinoma cervical, assim como acontece nos diversos tipos de tumores, onde essa enzima e/ou gangliosídeo ora apresentam-se relacionados a indução da carcinogênese, ora ao seu bloqueio. Em relação a expressão gênica, também não foi visto na literatura níveis de expressão altos, sendo que a maioria das pacientes apresentaram valores moderados a baixos.

Como o papel desta enzima não está claro na carcinogênese (embora a suspeita por desempenhar função pró-carcinogênica seja mais acentuada), é visto que seus níveis não demonstram ser decisivos quanto ao diagnóstico, o que é corroborado por esse estudo. Talvez a análise do conjunto de enzimas envolvidas na síntese dos gangliosídeos seja mais definitiva quanto a caracterizar o carcinoma ou algum estágio pré-neoplásico. Os níveis sorológicos, por sua vez, parecem ser mais fidedignos quanto a situação clínica da paciente. Uma análise conjunta dos dados de expressão em tecido e no sangue provavelmente será relevante no tocante tanto ao diagnóstico quanto ao prognóstico nos casos de câncer cervical.

4.6 EXPRESSÃO DA COX-2 (PAR COX2_6)

O perfil de expressão do RNAm da COX-2 (figura 30) apresentou diferentes padrões entre os estágios intraneoplásicos, havendo significância estatística tanto quando considerado o grupo normal ($p=0,0482$) quanto o grupo normal II ($p=0,0058$).

De modo geral, observa-se que a expressão desse gene se intensifica no estágio de NIC I em relação aos estágios normal ($p=0,0154$), normal II ($p=0,0020$), NIC II ($p=0,0217$) e câncer ($p=0,0223$), enquanto são mais baixos no estágio normal e normal II. Foi visto também que a presença do hrHPV tem sido importante na expressão deste gene, já que o grupo normal apresentou níveis maiores de expressão em relação ao grupo normal II ($p=0,0192$).



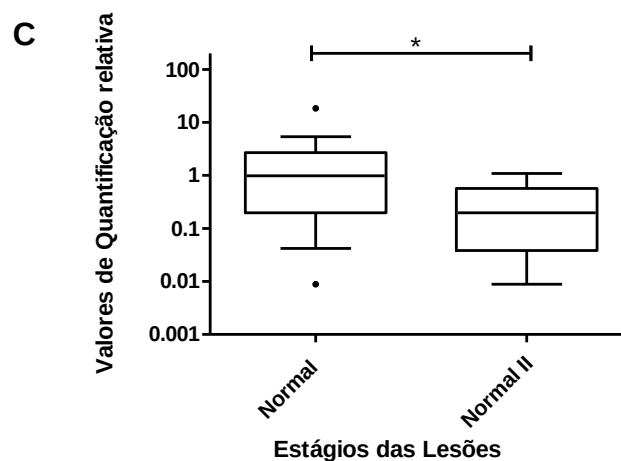


Figura 30. Níveis de expressão da COX-2. (A) Lesões de NIC I, NIC II, NIC III, câncer comparadas entre si e entre o grupo normal (A) e normal II (B). (C) Comparação entre os dois grupos normais.

A COX-2 possui papel chave no desenvolvimento do câncer de modo geral, o que também é visto na carcinogênese cervical. Foi visto que a COX-2 apresenta expressão elevada em vários tumores como o de esôfago, estômago, pulmão, mama, bexiga, ovário, cabeça e pescoço, colorretal (DIVVELA; CHALLA; TAGARAM, 2010; SEO et al., 2004), endométrio e pâncreas, estando também correlacionada a metástase e ao prognóstico desfavorável (BANNO et al., 2015; DIXON, 2003). Além disso, sua inibição tem suprimido a geração de tumores em modelos animais e humanos (DIXON, 2003; NASIR et al., 2007).

No câncer cervical, a expressão da COX-2 também se encontra constantemente elevada e relaciona-se com a diminuição da resposta imune, a progressão maligna (DAI et al., 2005; MANDIC et al., 2014), à metástase, ao prognóstico desfavorável (GAFFNEY et al., 2001) e a resistência à apoptose induzida por radioterapia (TILBORGHS et al., 2017). Por isso, inibidores da COX-2 estão sendo utilizados para aumentar a sensibilidade das células cervicais tumorais às drogas anti-neoplásicas e à radioterapia e, por conseguinte, aumentam a eficiência do tratamento, pois a ação dessa enzima leva a geração de várias condições clínico-patológicas desfavoráveis correlacionadas à sobrevivência do vírus e ao estabelecimento do câncer no organismo hospedeiro. A produção de PGE_2 por esta enzima, por exemplo, leva como principal efeito a imunomodulação, devido a inibição da ativação dos linfócitos T, o que contribui para ocorrência da infecção crônica e desenvolvimento da carcinogênese (DE FREITAS et al., 2017).

Alguns estudos têm descrito a expressão da COX-2 no câncer cervical. Em um estudo foi visto, de forma qualitativa, a presença da expressão proteica em 6 amostras de câncer cervical quando comparados com 7 do cérvix normal onde a COX-2 esteve ausente. Foi visto também que a ativação do EGF-R e de moléculas de sinalização como PI3K, MAPKs, p38 e c-jun interferiram na expressão (KULKARNI et al., 2001). Já Dai et al. (2005) verificou expressão (mRNA) aumentada em tecidos cervicais com inflamação, NIC e carcinoma quando comparados com cérvix normal, concluindo que a COX-2 é importante na carcinogênese cervical principalmente nos estágios iniciais (DAI et al., 2005) quando a presença do processo inflamatório é mais importante (BARROS et al., 2018a). Outro estudo, por meio da imuno-histoquímica, novamente constatou um aumento da expressão deste marcador no câncer comparando-se com as amostras sem alterações histopatológicas, estando presente em 56,52% das pacientes com câncer cervical (MANDIC et al., 2014). Um painel desses resultados e de outros estudos pode ser visto na tabela 10, todos demonstrando associação estatisticamente significativa entre a expressão da COX-2 e o câncer cervical quando comparados com os respectivos controles normais sem alterações histopatológicas. Além disso, correlações positivas estatisticamente significantes com alguns marcadores clínico-patológicos de mau prognóstico também foram encontradas como, por exemplo, a invasão linfo-vascular e a inflamação.

Embora não tenha havido significância estatística entre o grupo normal ou normal II x câncer nesse estudo, percebe-se que no segundo caso (normal II x câncer) houve um aumento visível da expressão no carcinoma em relação ao grupo normal II. Sendo a inflamação importante no processo de consolidação do tumor, houve expressão estatisticamente significativa nos estágios de NIC I e NIC III, ocorrendo aumento ainda mais significativo quando se compara o estágio de baixo grau com o de alto grau ($p=0,0404$) ou quando o grupo normal II é considerado. Verifica-se, portanto, que a expressão deste gene demonstra ser mais importante nos estágios iniciais da carcinogênese, assim como sugerido por Dai et al. (2005).

Tabela 10. Expressão da COX-2 no câncer cervical

ENSAIO EXPERIMENTAL	RESULTADOS	REFERÊNCIA
Avaliou a expressão de forma qualitativa (imuno-histoquímica) e quantitativa (ensaio da luciferase)	6 amostras de câncer cervical apresentaram expressão positiva enquanto as 7 sem alterações histopatológicas foram negativas. A expressão da COX-2 foi induzida pela ativação do EGF-R e outras moléculas de sinalização intracelular, como PI3K, MAPKs, p38 e c-jun.	(KULKARNI et al., 2001)
Avaliou a expressão por imuno-histoquímica em 62 amostras providas de LEEP (procedimento de excisão eletrocirúrgica por alça)	O número de amostras que apresentaram níveis elevados da expressão da COX-2, foi significativamente maior na displasia severa (em relação a displasia moderada e baixa), assim como a intensidade da coloração (2,1; 1,8; 1,6 respectivamente).	(FARLEY et al., 2004)
Avaliou a expressão por qPCR, imuno-histoquímica e radioimunoensaio	Foi visto aumento da expressão gênica em amostras cervicais com inflamação, NIC e carcinoma. Também foi observado correlação forte entre a COX-2 e as prostaglandinas e o VEGF foi mais expresso no carcinoma do que nos outros tipos de amostras de maneira estatisticamente significativa.	(DAI et al., 2005)
Avaliou 89 amostras parafinadas por imuno-histoquímica no estágio IB	Foi encontrado positividade para COX-2 em 49,4% das amostras, sendo significativamente mais frequente no adenocarcinoma (em relação ao carcinoma escamoso), na metástase	(MANCHANA et al., 2006)

	para os linfonodos (LM) e no envolvimento do paramétrio (PI). Não houve correlação estatisticamente significativa com a idade da paciente, o tamanho do tumor, a profundidade da invasão do estroma, a invasão linfo-vascular, a sobrevida livre de doença (SLD) por cinco anos nem com a sobrevida total por cinco anos.	
Avaliou, por imuno-histoquímica, a expressão da COX-2 e variáveis clínico-patológicas e de expressão de p53 em 84 amostras de adenocarcinoma da cérvix e 13 de carcinoma adenoescamoso	Observou que a expressão da COX-2 foi diferente de modo estatisticamente significativo entre os dois tipos histológicos AC e ASC (8,5% x 38,5%, respectivamente). Além disso, foi visto significância também entre a associação do aumento da COX-2 e o estágio tumoral, LM (mais evidente no AC do que no ASC, $p=0,023$) e a diminuição de ST (quando avaliado conjuntamente com a idade, estágio tumoral e LM). Não houve significância entre a expressão de p53 e de COX-2.	(KANG et al., 2006)
Avaliou por imuno-histoquímica a expressão da COX-2 em lesões de NIC III e SCC, relacionando com fatores de prognóstico, como tamanho do tumor e invasão linfo-vascular	Observou expressão mais intensa em lesões com SCC do que em NIC III. Houve também significância estatística para níveis aumentados de COX-2 e invasão linfo-vascular e tamanho do tumor (tumores maiores que 4 cm apresentaram níveis maiores de COX-2). Outros fatores como PI, LM, recorrência da doença e sobrevida não apresentam correlações significantes estatisticamente. Para a análise	(DURSUN et al., 2007)

	multivariada, a invasão linfo-vascular foi o único fator que apresentou significância estatística.	
Avaliou a expressão por imuno-histoquímica em 150 amostras entre os estágios IB-IIA com invasão linfo-vascular, relacionando com fatores de prognóstico	A expressão da COX-2 foi detectada em 49,3% dos casos. A expressão da COX-2 no espaço linfo-vascular (LV-COX-2) ocorreu em 40,7% dos casos. Houve correlação positiva da LV-COX-2 com a alta contagem da invasão linfo-vascular, sendo a LV-COX-2 um fator preditor da LM nessas amostras.	(SETTAKORN et al., 2009)
Avaliou a expressão de forma semi-quantitativa (imuno-histoquímica) de três tipos de câncer cervical: o escamoso invasivo, o <i>in situ</i> e o adenocarcinoma	Houve expressão mais intensa no câncer invasivo em relação ao <i>in situ</i> , sendo significativa ($p=0,002$), e no adenocarcinoma em relação ao invasivo, sendo neste caso não significativa ($p=0,112$). A expressão correlacionou-se de forma positiva com a invasão linfo-vascular ($p=0,001$), o que não ocorreu com o grau de diferenciação do tumor e com a presença de metástase, cujas correlações não foram significantes.	(BANDYOPADHYAY et al., 2011)
Realizou uma meta-análise a fim de avaliar o valor prognóstico da expressão da COX-2 no câncer cervical. 23 estudos que totalizaram	Foi observado que os altos níveis de COX-2 predisseram baixas taxas de ST, SLD e RQ, incluindo baixo ST em pacientes tratadas com quimiorradiação e cirurgia, e baixo SLD em pacientes que receberam quimiorradiação. Associações estatisticamente significantes também foram vistas com	(HUANG et al., 2013)

1447 pacientes foram associados quanto a ST, SLD, resposta a quimiorradiação (RQ) e parâmetros clinico-patológicos	os níveis de COX-2, como a idade, LM, tamanho do tumor, estágio FIGO, tipo histológico e PI. Para o grau do tumor a associação não foi significativa. Foi concluído que a COX-2 é um fator de prognóstico desfavorável e é fator preditivo de resistência a quimiorradiação. Esse tipo de conduta terapêutica é o principal tratamento para o câncer de colo uterino localmente avançado.
Avaliou a expressão de forma semi-quantitativa (imuno-histoquímica)	56,52% das amostras de câncer apresentaram expressão positiva, sendo 23,91% delas consideradas com níveis elevados, 15,22%, médios e 17,39% como baixos. Ainda foi visto correlação significativamente positiva entre a expressão da COX-2 e fatores de mau prognóstico (ausência de infiltração linfocítica, metástase para os linfonodos, infiltração vascular e infiltração no istmo do útero). (MANDIC et al., 2014)
Avaliou a expressão de 123 amostras de câncer cervical por imuno-histoquímica	A expressão da COX-2 foi detectada em 23% das pacientes, apresentando correlação estatisticamente significativa com maiores porcentagens de coloração em células tumorais em relação com as células estromais peritumorais. Além disso, a expressão da COX-2 apresentou correlação significativa com a presença de invasão linfo-vascular. (HOELLEN et al., 2016)

Outro fator que fundamenta essa ideia é o suporte oferecido pelos fibroblastos durante a carcinogênese nas fases iniciais. Segundo a *stromal cell-centered HPV-related carcinogenesis hypothesis* desenvolvida por nós, os fibroblastos enquanto não transformados em fibroblastos associados ao câncer (CAFs), podem contribuir, de fato, pela transformação celular e progressão neoplásica nos estágios iniciais pré-malignos. É visto que estas células estromais secretam fatores de crescimento e pró-inflamatórios, além de quimiocinas durante a fase displásica e nos estágios iniciais da carcinogênese, levando a uma mudança da arquitetura tecidual, a transição epitélio-mesenquimal e a proliferação celular dos queratinócitos (figura 54). Desta maneira, moléculas pró-inflamatórias ou envolvidas na sinalização intracelular estão com seus níveis elevados (BARROS et al., 2018a).

Portanto, sendo a COX-2 molécula importante no processo inflamatório e pertencente da via do NF- κ B – fator de transcrição central na carcinogênese em vários tumores incluindo o cervical –, pode estar sendo induzida e estar com seus níveis elevados durante o estágio de NIC I, como foi observado nesse trabalho. Pode-se observar que no estágio NIC I x normal houve significância estatística ($p<0,05$), semelhantemente com o que ocorreu quando se comparou quando se compara com NIC II e câncer; já quando se compara NIC I x normal II, o aumento ainda foi mais expressivo, sendo valor de $p<0,01$. Desta maneira, o resultado encontrado vem corroborando os dados encontrados na literatura que revelam uma relação direta entre a expressão da COX-2, a malignidade, a sua importância nos estágios iniciais e previamente a mudanças importantes (NIC I para NIC II e de NIC III para câncer) e o prognóstico desfavorável.

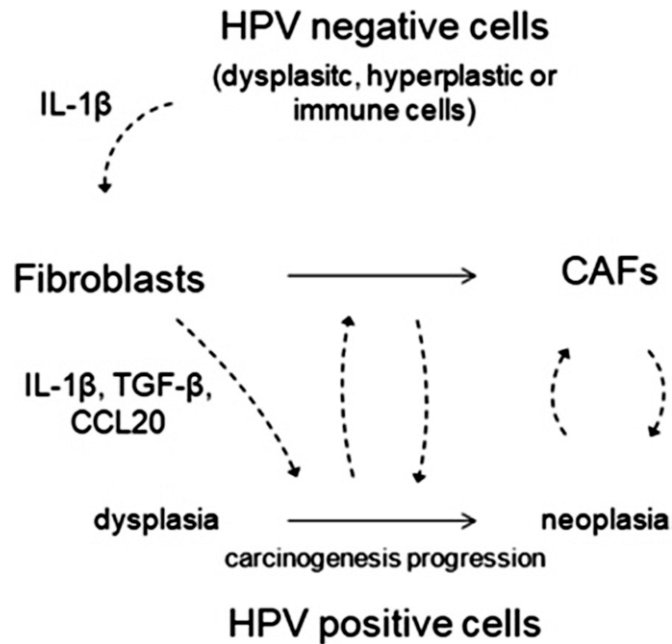


Figura 31. Stromal cell-centered HPV-related carcinogenesis hypothesis. Células que apresentam alterações (displásicas, hiperplásicas), ou células imunes induzem fibroblastos estromais (por IL-1 β , por exemplo), secretam IL-1 β , TGF- β e CCL20 no intuito de auxiliar que as células infectadas sofram transformação celular. Células HPV positivas, em estágio intermediário e final de neoplasia, induzem a alteração de fibroblastos em CAFs e estas interagem em uma alça de retroalimentação para induzir a carcinogênese cervical. Fonte: (BARROS et al., 2018a).

Além dos níveis de expressão da COX-2 estarem vinculados com as células cancerígenas, em processo de transformação, ou aos próprios fibroblastos estromais como descrito acima, o aumento da expressão pode estar correlacionado com a atividade dos fibroblastos associados ao câncer, um estágio fenotípico alterado dos fibroblastos comuns posteriormente a ação das células cancerígenas. Estas células estão situadas nas margens das células malignas, sendo sua principal função confirmar e aumentar uma situação favorável de microambiente tumoral pró-inflamatório propícia e vantajosa à transformação e progressão maligna das células infectadas.

Dessa maneira, as CAFs interagem de forma parácrina agindo de forma direta nos queratinócitos, o que ocorre em ambos os sentidos, como pode ser visto na figura 54 (BARROS et al., 2018a). As CAFs, portanto, podem estar associadas ao aumento da COX-2 nas fases de NIC III e de câncer observadas nesse estudo, confirmando a condição pró-inflamatória do microambiente pré-maligno e maligno. A própria indução da expressão da COX-2 nas células hospedeiras (por atividade dos oncogenes, por exemplo) e o consequente aumento nos níveis de PGE₂, leva a síntese de fatores de crescimento e angiogênicos mediados por esta prostaglandina, como o bFGF e VEGF

respectivamente, os quais são essenciais para o aumento do processo inflamatório, do remodelamento da matriz extracelular e da transição epitélio-mesenquimal, centrados na indução da geração e proliferação das CAFs. Sendo assim, os queratinócitos e CAFs integram um mecanismo de retroalimentação onde estes tipos celulares mantêm-se em ativação mutuamente (BARROS et al., 2018a; SALES; KATZ, 2012). Além disso, assim como a COX-2 está relacionada aos estágios iniciais da carcinogênese, a expressão desse marcador também se associa aos estágios tardios (HULL, 2005), o que é visto também nesse estudo, pois o processo inflamatório mantém-se até o estágio de carcinoma.

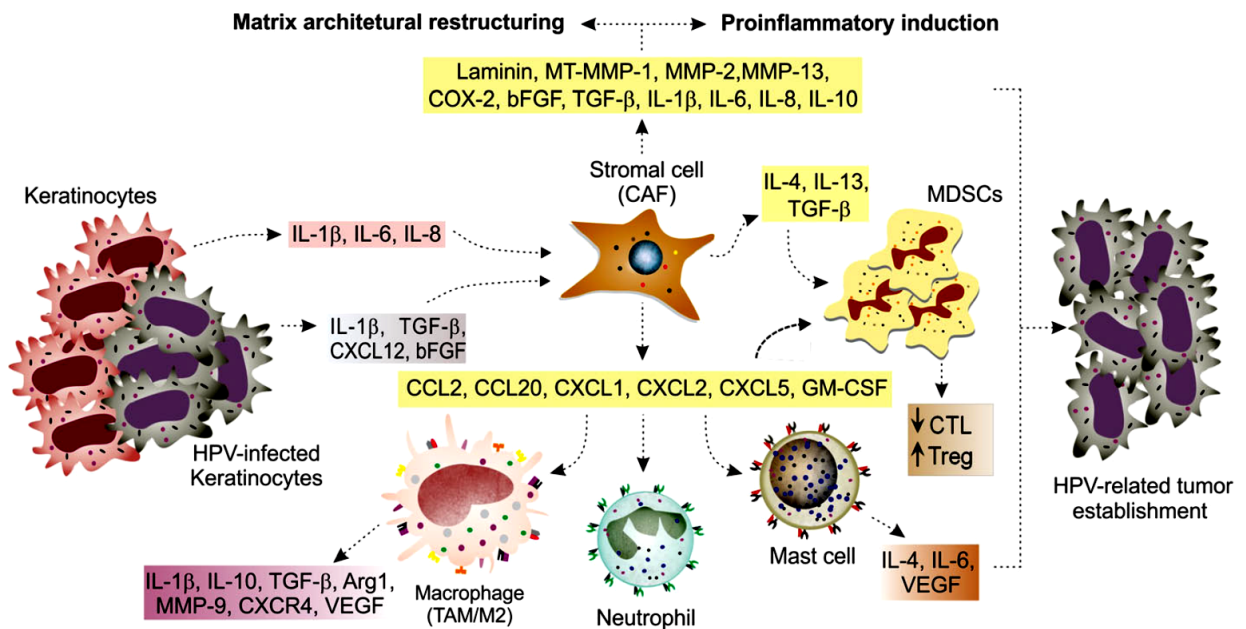


Figura 32. Papel das células estromais. As células estromais auxiliam na carcinogênese do câncer cervical por meio de estimulação parácrina, desempenhando um papel central na carcinogênese cervical. Citocinas e quimiocinas secretadas pelos queratinócitos e células infectadas pelo HPV (IL-1 β , IL-6, IL-8, TGF- β , CXCL12 e bFGF) induzem a transformação de fibroblastos comuns para se tornarem CAFs, que secretam vários fatores pró-inflamatórios, quimioatraentes e moléculas remodeladoras da matriz extracelular. Este remodelamento causa alteração da polaridade celular, migração, comunicação célula-célula e crescimento celular. A ativação e atração das células imunes inflamatórias e modulatórias, incluindo macrófagos M2 (TAM), neutrófilos (TAN), mastócitos e células mieloderivadas supressoras, por meio de citocinas chave, auxiliam adicionalmente, na criação de um microambiente tumoral favorável ao estabelecimento da inflamação crônica e progressão carcinogênica, além de uma resposta imune ineficaz, onde as respostas citotóxicas dos linfócitos T e das células NK são inibidas, ao contrário do que ocorre com as células Treg, os quais são ativadas. Um exemplo de como essa interação queratinócito infectado/CAF pode ocorrer em prol do estabelecimento e desenvolvimento do câncer se dá por meio da COX-2. A indução da expressão deste fator pelos oncogenes virais promove a síntese de PGE₂, o qual induz a expressão gênica de fatores de crescimento, como bFGF que, por sua vez, age sobre as CAFs. Estas, por seu lado, secretam vários fatores pró-inflamatórios, como por exemplo, o IL-1 β , que é capaz de agir de volta sobre os queratinócitos potencializando a expressão da COX-2. Fonte: (BARROS et al., 2018a).

É bem estabelecido que a inflamação desempenha papel fundamental para a geração do câncer (HANAHAAN; WEINBERG, 2000), o que foi sugerido inicialmente por Virchow et al. (1858) há mais de um século (VIRCHOW; REIZUNG; REIZBARKEIT, 1858). No câncer cervical, essa condição inflamatória também é predita na literatura (BARROS et al., 2018a, 2018b; BOCCARDO; LEPIQUE; VILLA, 2010) e esse processo intensifica-se durante a progressão para estágios de maior malignidade (WOODBYP; SCOTT; BODILY, 2016). Foi observado, por exemplo, que o processo inflamatório era exacerbado em lesões de alto grau de pacientes infectadas por hrHPV (CASTLE et al., 2001), e que as CAFs contribuíam de maneira importante para o aumento da atividade pró-inflamatória das células imunes por meio da expressão de moléculas como IL-6, IL-8, quimiocinas (p.ex. CXCL1, 2 e 5), NF- κ B e COX-2 (BARROS et al., 2018a). Inclusive já foi reportado na literatura que a expressão de marcadores dos CAFs foi encontrado em maiores níveis nos estágios de NIC I, III e carcinoma (WOODBYP; SCOTT; BODILY, 2016), coincidentemente os estágios que apresentaram os maiores níveis de expressão nesse estudo. Níveis elevados de IL-6 e IL-8 também estiveram com níveis elevados em lavagens cervico-vaginais associadas ao câncer cervical assim como em pacientes com lesões intraepiteliais (TJIONG et al., 1999).

Além desses indicadores da atividade pró-inflamatória, outros também foram reportados em lesões de NIC e câncer cervical, como o aumento da razão Th17/Treg (no sangue periférico e nas lesões cervicais), o aumento dos níveis de IL-1 (IL-1 α , - β) e de mediadores induzidos por este como TGF- β , VEGF, metaloproteinases e moléculas de adesão endoteliais (BARROS et al., 2018b). Complementarmente, ainda ocorrem o aumento de células imunocompetentes pró-inflamatórias como os macrófagos, neutrófilos e fibroblastos associados ao tumor e as células mielo-derivadas supressoras (BARROS et al., 2018a),

4.7 CORRELAÇÃO ENTRE OS GENES ESTUDADOS

As possíveis correlações entre a expressão dos genes estudados foram avaliadas pelo teste de hipóteses de Spearman, que avalia o grau de correlação entre as variáveis cujos dados estão distribuídos de forma não-normal. Conforme visto na tabela 11 a seguir, pode ser observado que houve correlação positiva com

significância estatística entre a expressão dos genes: E5HPV16 x E5HPV58, E5HPV31 x GM1, E5HPV58 x Cav1, Cav1 x GM1, Cav1 x COX-2 e GM1 x COX-2.

As correlações que apresentaram significância estatística também foram avaliadas quanto aos estágios pré-neoplásicos (incluindo o estágio de alto grau, quando as lesões NIC II e III estão agrupadas juntamente) para observação em qual momento as correlações apresentavam significância estatística (tabela 12). Foi visto que as expressões dos E5 dos HPV16 e HPV58 apresentaram correlações perfeitas nos estágios de NIC I, III e carcinoma. Além disso foram observadas correlações significantes para: E5 (HPV 31) x GM1 em NIC I, cav-1 x GM1 em NIC I, cav-1 x COX-2 em NIC II, alto grau e carcinoma, e GM1 x COX-2 no estágio de alto grau. Embora para o E5 (HPV 58) x cav-1 não tenha apresentado correlação significativa em nenhum estágio, em lesões com alto grau o valor de p foi quase significativo ($p=0,065$).

Tabela 11. Correlações entre a expressão dos genes avaliados

	E5 HPV16	E5 HPV31	E5 HPV58	CAV1	GM1	COX2
E5	-	0,0154	0,8571	0,2294	0,3261	0,0342
HPV16	-	$p=0,96$	$p=0,0137$	$p=0,18$	$p=0,056$	$p=0,85$
E5	-	-	0,60	0,0597	0,4240	-0,0431
HPV31	-	-	$p=0,21$	$p=0,75$	$p=0,017$	$p=0,82$
E5	-	-	-	0,5316	0,3	0,2053
HPV58	-	-	-	$p=0,019$	$p=0,21$	$p=0,399$
CAV1	-	-	-	-	0,3918	0,5912
					$p=0,0001$	$p<0,0001$
GM1	-	-	-	-	-	0,2877
						$p=0,0054$
COX2	-	-	-	-	-	-

Tabela 12. Correlações estatisticamente significantes x estágios da progressão carcinogênica

	Normal	Normal II	NIC I	NIC II	NIC III	Alto grau	Câncer
E5							
HPV16			1,00		1,00	1,00	
x E5	-	-	p=0,000	-	p=0,000	p=0,000	-
HPV58							
E5							
HPV58	- 0,60		0,50	0,50	0,4048	0,5727	
x	p=0,40	-	p=0,667	p=0,667	p=0,319	p=0,065	-
CAV1							
E5							
HPV31	-	-	0,7636	0,0714	0,3714	0,2176	0,8
x GM1			p=0,0062	p=0,87	p=0,47	p=0,45	p=0,2
CAV1							
x	0,2446	0,2571	0,5234	0,3278	0,2421	0,3141	0,4615
GM1	p=0,328	p=0,623	p=0,015	p=0,158	p=0,304	p=0,048	p=0,112
CAV1							
x	0,4469	- 0,1429	0,4065	0,7654	0,3714	0,6329	0,6593
COX2	p=0,063	p=0,787	p=0,675	p=0,0001	p=0,107	p<0,0001	p=0,014
GM1							
x	- 0,216	- 0,2571	0,3883	0,3654	0,3278	0,366	0,5
COX2	p=0,39	p=0,623	p=0,082	p=0,113	p=0,158	p=0,02	p=0,08

Obs: as células com o "-" apresentaram número de amostras insuficientes para obtenção do resultado estatístico.

4.7.1 Correlação entre os oncogenes E5 dos genótipos 16, 31 e 58

A respeito das coinfeções, observa-se que E5 HPV16 e E5 HPV31 apresentaram correlação muito insignificante, nem sendo positiva nem negativa. O contrário ocorreu quando estes dois genes foram comparados com o E5 HPV58 (houve significância quando comparado com o E5 HPV16).

4.7.2 E5 HPV58 X CAV-1

Foi visto por Suprynowicz et al. (2008) que a oncoproteína E5 (HPV16) foi responsável pela indução da expressão gênica da cav-1 e GM1 em linhagens de ectoderma humano (SUPRYNOWICZ et al., 2008). No entanto, para o E5 do HPV58 esta relação ainda não foi avaliada. Neste estudo foi visto uma significativa entre a expressão deste oncogene com o gene da cav-1 e, possivelmente, também exerça uma indução semelhante ao que ocorre com seu semelhante do genótipo 16. Para este genótipo e o 31, não foram observadas correlações significativas com a cav-1.

4.7.3 E5 HPV31 X GM1

Foi encontrado correlação significativa entre a expressão do oncogene E5 do HPV31 e a gangliosídeo sintase-1, sendo esta mais evidente no estágio NIC I. Previamente foi reportado que o oncogene E5 do HPV16, na presença dos outros dois oncogenes (E6 e E7), induziu o aumento da expressão deste glicosfingolípido na *lipid raft* juntamente com a cav-1, o que ocasionaria um possível efeito imunoevasivo (SUPRYNOWICZ et al., 2008). Este resultado então, é um primeiro relato que pode indicar uma relação deste gangliosídeo, dessa vez, com o oncogene E5 do genótipo 31, assim como ocorre com o do genótipo 16.

4.7.4 CAV-1 X GM1

A cav-1 apresentou correlação direta estatisticamente significativa com o GM1, sendo mais evidente nos estágios NIC I e alto graus. A cav-1 e o GM1 constituem o *lipid raft* e interagem entre si. Juntos esses dois componentes são importantes em várias funções biológicas da célula, sendo a principal delas a transdução de sinal. Dessa maneira, é possível que os níveis desses dois componentes estejam relacionados diretamente. Suprynowicz et al. (2008), por exemplo, demonstraram *in vitro* que o oncogene E5 aumentou a expressão desses dois marcadores em células de ectoderma humano (SUPRYNOWICZ et al., 2008).

4.7.5 CAV-1 X COX-2

Dentre as correlações entre os genes alvos do hospedeiro avaliadas nesse estudo, a correlação entre a cav-1 e a COX-2 foi a mais acentuada, apresentando o maior coeficiente entre os calculados (0,5912) com valor de p bastante significativo, $<0,0001$. Quando a correlação foi avaliada no decorrer dos estágios pré-neoplásicos houve significância estatística em NIC II, nas lesões de alto grau e no carcinoma.

A caveolina-1, como descrito anteriormente, faz parte dos *lipid rafts*, os quais são regiões da membrana plasmática que apresentam atributos próprios, sendo importante então na transdução de sinal. Estas proteínas relacionam-se com vários receptores quinases, entre eles o EGF-R. Este receptor, por sua vez, está diretamente relacionado com a COX-2, pois sua ativação induz a atividade desta enzima e a produção de eicosanoides e fatores angiogênicos como o VEGF. Dessa maneira, a cav-1 pode relacionar-se com a COX-2 desta maneira. Embora a cav-1 promova a inibição deste receptor e isso pode justificar a relação inversa que estes dois marcadores apresentaram em outros cânceres, o aumento em seus níveis pode representar uma tentativa antitumoral frente a ativação do EGF-R pela oncoproteína E5 que, por sua vez, leva ao aumento nos níveis da COX-2 (DE FREITAS et al., 2017). Foi reportado também na literatura que o oncogene E5 (HPV16) induz a expressão da cav-1 (SUPRYNOWICZ et al., 2008). Um dado favorável a esta hipótese reflete-se na correlação inversa apresentada por estes marcadores somente no grupo normal II, quando as amostras positivas para os hrHPVs foram retiradas da avaliação. Embora esta correlação não tenha sido estatisticamente significativa, o reduzido número de amostras para esta situação possa ter contribuído para este resultado.

Sendo o papel da cav-1 incerto quanto a carcinogênese, é difícil compreender como esta proteína pode interagir com outras no contexto do desenvolvimento do câncer. Soma-se a isso a contribuição das células estromais no quantitativo da expressão gênica. Foi demonstrado uma relação direta entre os níveis da cav-1 provindo dessas células e o prognóstico da paciente, isto é, níveis baixos desta proteína prediz um prognóstico desfavorável quanto a resolução no câncer (neste caso, avaliado no câncer de mama) (WITKIEWICZ et al., 2009).

De forma semelhante a cav-1 ocorre também nos *lipid droplets*, organelas ricas em lipídios cujos níveis aumentam em condições inflamatórias e de câncer. Foi

reportado que a COX-2 também está presente nessas estruturas, contribuindo para a conversão do ácido araquidônico em eicosanoides a fim de elevar a resposta inflamatória (BOZZA; VIOLA, 2010). Sendo assim, essas duas proteínas poderiam estar relacionadas de forma direta na tentativa de contribuir para o estabelecimento da condição inflamatória exibida no câncer de modo geral.

4.7.6 GM1 X COX-2

Assim como ocorreu com a cav-1 e a COX-2, o GM1 também apresentou correlação positiva estatisticamente significativa com a COX-2, sendo mais relevante no estágio alto grau. Todas as três correlações desses três marcadores entre si foram estatisticamente significantes em lesões de alto grau. Como discutido para o cav-1, a COX-2 pode correlacionar-se com a GM1 devido a relação de ambos com receptores quinases envolvidos na carcinogênese cervical presentes na membrana plasmática, como o EGF-R. Outro ponto de confluência entre esses dois marcadores está a influência dos oncogenes como o próprio E5. Foi descrito que a oncoproteína E5 (HPV16) induz a expressão destes dois alvos (DE FREITAS et al., 2017).

4.7.7 COX-2 X Oncogenes E5

No caso da COX-2, foi observado significância estatística somente quando comparados com a CAV1 e o GM1, sem demonstrar alguma correlação importante com o E5 de qualquer dos genótipos estudados. Mesmo quando os dados de expressão dos E5 de todos os genótipos foram combinados, não foi visto correlação importante: $\rho = -0,0145$ ($p=0,911$). É relatado na literatura que o E5 HPV16 interfere na expressão de COX-2 de várias formas. A primeira delas é que este oncogene provoca a aumenta a expressão do EGF-R na superfície celular e, portanto, da sua via de sinalização, o que inclui a COX-2. O aumento da atividade deste marcador provoca o aumento nos níveis de PGE_2 e VEGF, o que resulta em impedimento da maturação, proliferação e quimiotaxia dos linfócitos T, além de inibir sua interação com as APCs. Adicionalmente, ainda ocorre a diminuição da apoptose (devido aumento da degradação de Bax) e o aumento da angiogênese. Todas estas atividades

relacionam-se ao desenvolvimento tumoral e pior prognóstico (DE FREITAS et al., 2017). Em nossos resultados, como discutido anteriormente, foi visto aumento da expressão deste gene nos estágios de NIC I e NIC III.

Outra maneira que E5 HPV16 contribui para o aumento da atividade da COX-2 é induzindo sua expressão gênica por meio do AP-1 e pela ativação do NF- κ B e do CREB. Estes fatores de transcrição ligam-se a regiões promotoras da COX-2 (como descrito anteriormente na seção 2.7), aumentando sua transcrição (DE FREITAS et al., 2017). Sabe-se que o estímulo da atividade promotora da COX-2 é dependente da ligação do NF- κ B e parcialmente dependente da ligação no sítio de ligação CRE (elemento responsivo ao cAMP) (TILBORGHS et al., 2017).

Ainda pode ser inferido outra maneira que E5 HPV16 pode contribuir para a expressão da COX-2. É visto que essa oncoproteína altera a via de transdução de sinal do TGF- β , desviando-a da via do SMAD2/SMAD4 para outras concorrentes como a via do Ras/Raf/MAPK e a via do PI3K/Akt, vias estas que também são utilizadas pelo EGF-R. Tanto a primeira quanto a segunda cascata de sinalização resulta na geração de fatores de transcrição que promovem a transcrição do gene da COX-2: a primeira leva a ativação do CRE e a segunda a ativação do elemento NF- κ B. Sendo assim, não somente pela ativação da EGF-R quanto pela ativação direta de fatores de transcrição pró-COX-2, a E5 do HPV16 pode contribuir indiretamente por meio da ativação do TGF- β a transcrição do gene COX-2. A figura 33 demonstra esse raciocínio mais claramente.

Embora não se tenha observado uma correlação entre o E5 e o COX-2 em nossas amostras, o que pode ter ocorrido devido ao *n* insuficiente de amostras, constatou-se que a COX-2 apresentou diferentes padrões de expressão quando, na amostra, havia a presença ou ausência de pelo menos um dos hrHPVs avaliados. Sendo assim, talvez outro oncogene (E6 ou E7) viral, ou ainda, uma reação indireta do hospedeiro à presença viral esteja provocando tal alteração na expressão gênica do COX-2. De fato, foi reportado a indução da expressão da COX-2 pelo E6 e E7 do HPV16 *in vitro*. Eles promoveram a ativação da expressão da COX-2 de diversas maneiras: por meio da ativação do EGF-R, da indução da ligação do AP-1 ao elemento responsivo ao cAMP no promotor da COX-2 (CRE), do recrutamento de fatores de transcrição fosforilados como o c-jun, c-fos, Ubch5 e a proteína ligadora do elemento responsivo ao cAMP/p300 ao promotor da COX-2, além de inibir a ligação do

complexo co-repressor receptor da histona deacetilase 3-nuclear do promotor da COX-2 (SUBBARAMAIAH; DANNENBERG, 2007).

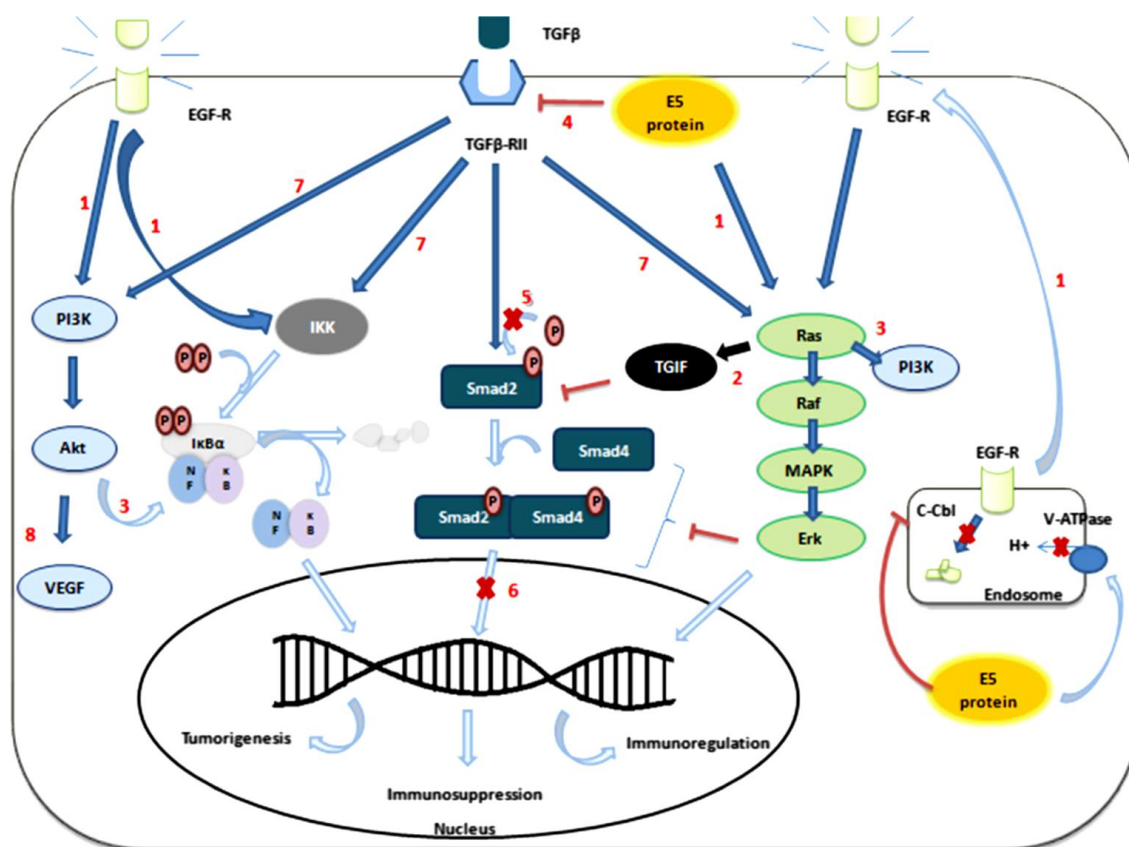


Figura 33. Interferência da oncoproteína E5 nas cascatas de sinalização do EGF-R e TGF-β.

EGF-R e TGF-β compartilham de vias de transdução de sinal, então a interferência do E5 HPV16 em quaisquer de um desses receptores tem efeitos sobre as vias de sinalização de um sobre o outro. TGF-β é uma importante citocina imunossupressora que ativa diferentes vias de transdução que sofrem interferência pela oncoproteína E5 HPV16. Quando não há infecção, a via do SMAD é priorizada, o que muda durante a infecção pelo hrHPV, quando as vias alternativas são ativadas no lugar da via do SMAD por diversos mecanismos: (1) aumento dos níveis de EGF-R na membrana celular, o que leva a ativação da via do NF-κB e PI3K; (2 e 3) estabilização do TGIF (co-inibidor da via do SMAD) por Ras e interação das vias entre si em uma rede intrínseca de regulação; (5) fosforilação da SMAD2 e o (6) impedimento da translocação do complexo SMAD2-SMAD4 para o núcleo; (7) indução da via do NF-κB de modo direto e indireto. Fonte: (DE FREITAS et al., 2017).

Deve-se considerar também que múltiplos fatores contribuem para expressão gênica e uma avaliação de uma relação direta entre eles somente é possível em modelos fechados como em cultura de células ou por meio do uso de iRNAs por exemplo. Nestes casos, pode-se observar a expressão única de um dos dois genes para constatar a modulação da expressão sobre seu alvo quando se compara quando o gene em questão estiver ausente. A COX-2, por exemplo, possui uma variedade de estimuladores extra- e intracelulares, principalmente por possuir expressão não-

constitutiva e vinculada por diversas situações ou moléculas, como o LPS, IL-1, TNF, TGF- α , IFN- γ , PAF, o próprio EGF etc, o que deixa sua avaliação ainda mais intrincada.

5 CONCLUSÃO

Nesse estudo, amostras cervicais obtidas de mulheres com lesões de diferentes graus foram genotipadas e o padrão de prevalência seguiu o já reportado na literatura para a região nordeste e o estado de Pernambuco, sendo o HPV16 mais frequente seguido dos genótipos 31 e 58.

Observou-se que o oncogene E5, independente do genótipo, não apresentou um perfil de expressão diferente entre os estágios pré-neoplásicos, notando-se uma tendência em aumentá-la no estágio NIC III e câncer. Para os alvos, destaca-se o aumento da expressão do gene da cav-1 em NIC I e da COX-2 em NIC I e NIC III. Sendo assim, pode-se sugerir que os níveis de expressão gênica dessas duas proteínas apresentam potencial em ser utilizadas como biomarcadores.

REFERÊNCIAS

- ARIELLY, S. S. et al. Quantitative analysis of caveolin-rich lipid raft proteins from primary and metastatic colorectal cancer clones. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 9, p. 2629–2637, 17 maio 2012.
- ARREGUI, A. C. Editorial - ONCOGENIC HUMAN PAPILLOMAVIRUSES - High-Risk Human Papillomaviruses: Towards a Better Understanding of the Mechanisms of Viral Transformation, Latency and Immune-Escape. **The Open Virology Journal**, v. 6, n. 1, p. 160–162, 28 dez. 2012.
- BALLIET, R. M. et al. Mitochondrial oxidative stress in cancer-associated fibroblasts drives lactate production, promoting breast cancer tumor growth. **Cell Cycle**, v. 10, n. 23, p. 4065–4073, 28 dez. 2011.
- BANDYOPADHYAY, R. et al. A study on expression pattern of cyclooxygenase-2 in carcinoma of cervix. **Indian journal of pathology & microbiology**, v. 54, n. 4, p. 695–9, 2011.
- BANNO, K. et al. Drug Repositioning for Gynecologic Tumors: A New Therapeutic Strategy for Cancer. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1–10, 3 fev. 2015.
- BARBARESI, S. et al. Effects of human papillomavirus type 16 E5 deletion mutants on epithelial morphology: functional characterization of each transmembrane domain. **Journal of General Virology**, v. 91, p. 521–530, 2010.
- BARROS, M. R. et al. Activities of stromal and immune cells in HPV-related cancers. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 37, p. 137, 2018a.
- BARROS, M. R. et al. Viral Modulation of TLRs and Cytokines and the Related Immunotherapies for HPV-Associated Cancers. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, p. 1–17, 2 maio 2018b.
- BAUD, V.; KARIN, M. Is NF- κ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 1, p. 33–40, 1 jan. 2009.
- BOCCARDO, E.; LEPIQUE, A. P.; VILLA, L. L. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 11, p. 1905–1912, 1 nov. 2010.
- BOURAS, T.; LISANTI, M. P.; PESTELL, R. G. Caveolin-1 in breast cancer. **Cancer biology & therapy**, v. 3, n. 10, p. 931–41, out. 2004.
- BOZZA, P. T.; VIOLA, J. P. B. Lipid droplets in inflammation and cancer. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 82, n. 4–6, p. 243–250, abr. 2010.
- CARVER, L. A.; SCHNITZER, J. E. Caveolae: mining little caves for new cancer targets. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 8, p. 571–581, ago. 2003.
- CASTLE, P. E. et al. An association of cervical inflammation with high-grade cervical

neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 10, n. 10, p. 1021–7, out. 2001.

CHAN, P. K. S. et al. Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 49, n. 4, p. 117–136, 2012.

CHANG, J. L. et al. The expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix. **Journal of biomedical science**, v. 8, n. 2, p. 206–13, 2001.

CHATTERJEE, M. et al. Caveolin-1 is Associated with Tumor Progression and Confers a Multi-Modality Resistance Phenotype in Pancreatic Cancer. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 10867, 12 set. 2015.

CHEN, J. et al. Mapping of HPV transcripts in four human cervical lesions using RNAseq suggests quantitative rearrangements during carcinogenic progression. **Virology**, v. 462–463, p. 14–24, 1 ago. 2014.

CHUNG, T.-W. et al. The function of cancer-shed gangliosides in macrophage phenotype: involvement with angiogenesis. **Oncotarget**, v. 8, n. 3, p. 4436–4448, 17 jan. 2017.

Colo do Útero. Disponível em:

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/definicao>. Acesso em: 11 set. 2017.

CORDEIRO, M. N. **Imunização genética contra o câncer cervical baseado no oncogene E5 do papilomavírus humano tipo 16.** [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

COUET, J.; SARGIACOMO, M.; LISANTI, M. P. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 48, p. 30429–38, 28 nov. 1997.

CRESPO, F. A. et al. The immunoregulatory effects of gangliosides involve immune deviation favoring type-2 T cell responses. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, p. 586–595, 2006.

DAI, Y. et al. The expression of cyclooxygenase-2, VEGF and PGs in CIN and cervical carcinoma. **Gynecologic oncology**, v. 97, n. 1, p. 96–103, 1 abr. 2005.

DAY, P. M. et al. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. **Journal of virology**, v. 72, n. 1, p. 142–50, jan. 1998.

DAY, P. M. et al. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by

promyelocytic leukemia protein (PML) expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 39, p. 14252–7, 28 set. 2004.

DAY, P. M. et al. Involvement of nucleophosmin (NPM1/B23) in assembly of infectious HPV16 capsids. **Papillomavirus Research**, v. 1, p. 74–89, 2015.

DE FREITAS, A. C. et al. hrHPV E5 oncoprotein: immune evasion and related immunotherapies. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 36, n. 1, p. 71, 25 maio 2017.

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

DEWALD, J. H. et al. TNF differentially regulates ganglioside biosynthesis and expression in breast cancer cell lines. 2018.

DIMAIO, D.; MATTOON, D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. **Oncogene**, v. 20, n. 54, p. 7866–7873, 28 nov. 2001.

DIMAIO, D.; PETTI, L. M. The E5 proteins. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 99–114, 2013.

DIVVELA, A. K. C.; CHALLA, S. R.; TAGARAM, I. K. **Pathogenic Role of Cyclooxygenase-2 in Cancer** *Journal of Health Science*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[http://jhs.pharm.or.jp/data/56\(5\)/56_502.pdf](http://jhs.pharm.or.jp/data/56(5)/56_502.pdf)>. Acesso em: 11 set. 2018.

DIXON, D. A. Regulation of COX-2 Expression in Human Cancers. In: **COX-2**. Basel: KARGER, 2003. p. 52–71.

DONG, W. et al. MicroRNA-337 inhibits cell proliferation and invasion of cervical cancer through directly targeting specificity protein 1. **Tumor Biology**, v. 39, n. 6, p. 101042831771132, 22 jun. 2017.

DONG, Y. et al. GM1/GD1b/GA1 synthase expression results in the reduced cancer phenotypes with modulation of composition and raft-localization of gangliosides in a melanoma cell line. **Cancer Science**, v. 101, n. 9, p. 2039–2047, set. 2010.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, n. SUPPL., p. 7–15, 2005.

DOORBAR, J. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in medical virology**, v. 25, p. 2–23, 2016.

DURSUN, P. et al. Cyclooxygenase-2 expression in cervical intraepithelial neoplasia III and squamous cell cervical carcinoma, and its correlation with clinicopathologic variables. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 17, n. 1, p. 164–173, jan. 2007.

ENGELMAN, J. A. et al. Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. **FEBS Letters**, v. 428, n. 3, p. 205–211, 29 maio 1998a.

ENGELMAN, J. A. et al. Molecular genetics of the caveolin gene family: implications for human cancers, diabetes, Alzheimer disease, and muscular dystrophy. **American journal of human genetics**, v. 63, n. 6, p. 1578–87, dez. 1998b.

ENGELMAN, J. A.; ZHANG, X. L.; LISANTI, M. P. Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers. **FEBS letters**, v. 436, n. 3, p. 403–10, 9 out. 1998.

Expression of B3GALT4 in cancer. Disponível em:

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000235863-B3GALT4/pathology#gene_information>. Acesso em: 21 set. 2018.

Expression of CAV1 in cancer. Disponível em:

<<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000105974-CAV1/pathology>>. Acesso em: 21 set. 2018.

FACINA, T. **Estimativa 2012 - Incidência de Câncer no Brasil** *Revista Brasileira de Cancerologia*. [s.l.: s.n.]. Disponível em:

<http://www.inca.gov.br/Rbc/n_57/v04/pdf/13_resenha_estimativa2012_incidencia_de_cancer_no_brasil.pdf>. Acesso em: 18 set. 2018.

FARLEY, J. et al. Cyclooxygenase-2 expression predicts recurrence of cervical dysplasia following loop electrosurgical excision procedure. **Gynecologic Oncology**, v. 92, n. 2, p. 596–602, fev. 2004.

FERNANDES, J. et al. Prevalence of human papillomavirus type 58 in women with or without cervical lesions in northeast Brazil. **Annals of medical and health sciences research**, v. 3, n. 4, p. 504–10, out. 2013.

FERRANDINA, G. et al. Increased cyclooxygenase-2 expression is associated with chemotherapy resistance and poor survival in cervical cancer patients. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 20, n. 4, p. 973–81, 15 fev. 2002.

FERRANDINA, G. et al. **Celecoxib Modulates the Expression of Cyclooxygenase-2, Ki67, Apoptosis-Related Marker, and Microvessel Density in Human Cervical Cancer: A Pilot Study**. [s.l.: s.n.]. Disponível em:

<<https://pdfs.semanticscholar.org/84ab/bba714738525789064f2d042f117fd4497bb.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2018.

FINE, S. W. et al. Elevated Expression of Caveolin-1 in Adenocarcinoma of the Colon. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 115, n. 5, p. 719–724, 1 maio 2001.

FRANK, A. **O Diário de Anne Frank**. 1. ed. [s.l.] Editora Record, 1995.

FU, P. et al. The different functions and clinical significances of caveolin-1 in human adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 10, p. 819–835, fev. 2017.

GAFFNEY, D. K. et al. Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with diminished survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. **International journal of radiation oncology, biology, physics**, v. 49, n. 5, p. 1213–7, 1 abr. 2001.

GALBIATI, F. et al. Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 22, p. 6633–6648, 16 nov. 1998.

GALBIATI, F. et al. Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism. **Molecular biology of the cell**, v. 12, n. 8, p. 2229–2244, 2001.

GENTHER, S. M. et al. Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. **Journal of virology**, v. 77, n. 5, p. 2832–42, mar. 2003.

GONÇALVES, M. A. G.; DONADI, E. A. Immune cellular response to HPV: current concepts. **The Brazilian journal of infectious diseases**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2004.

GRABOWSKA, A. K.; RIEMER, A. B. The invisible enemy - how human papillomaviruses avoid recognition and clearance by the host immune system. **The open virology journal**, v. 6, p. 249–56, 2012.

GROUX-DEGROOTE, S. et al. Gangliosides in Cancer Cell Signaling. In: **Progress in molecular biology and translational science**. [s.l.: s.n.]. v. 156p. 197–227, 2018.

GUAN, F. et al. Functional role of gangliotetraosylceramide in epithelial-to-mesenchymal transition process induced by hypoxia and by TGF- β . **The FASEB Journal**, v. 24, n. 12, p. 4889–4903, dez. 2010.

GURGEL, A. P. A. D. et al. 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 Research International**, v. 2015, 2015.

HAARHUIS, J. **Caveolae and cancer The controversial role of caveolin-1**. [s.l.: s.n.].

HÄFNER, N. et al. Integration of the HPV16 genome does not invariably result in high levels of viral oncogene transcripts. **Oncogene**, v. 27, n. 11, p. 1610–1617, 10 mar. 2008.

HAINES, P. et al. Elevated expression of cav-1 in a subset of SSc fibroblasts contributes to constitutive Alk1/Smad1 activation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 16, n. 9, p. 2238–2246, 2012.

HAMAMURA, K. et al. GM1 expression in H-ras-transformed NIH3T3 results in the suppression of cell proliferation inducing the partial transfer of activated H-ras from non-raft to raft fraction. **International journal of oncology**, v. 26, n. 4, p. 897–904, abr. 2005.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.

HARRIS, R. E.; CASTO, B. C.; HARRIS, Z. M. Cyclooxygenase-2 and the inflammogenesis of breast cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 4, p. 677, 10 out. 2014.

HELLEMANS, J. et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology**, v. 8, n. 2, p. R19, 2007.

HOELLEN, F. et al. Expression of cyclooxygenase-2 in cervical cancer is associated with lymphovascular invasion. **Oncology letters**, v. 12, n. 4, p. 2351–2356, out. 2016.

HOFFMAN, B. et al. **Ginecologia de Williams**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2014.

HPV and Cancer - National Cancer Institute. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents/hpv-fact-sheet>>. Acesso em: 30 jan. 2017.

HU, H. et al. Elevated COX-2 Expression Promotes Angiogenesis Through EGFR/p38-MAPK/Sp1-Dependent Signalling in Pancreatic Cancer OPEN. **Scientific Reports**, p. 1–10, 2017.

HUANG, M. et al. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 in cervical cancer: A meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 132, n. 2, p. 363–373, 15 jan. 2013.

HULL, M. A. Cyclooxygenase-2: How good is it as a target for cancer chemoprevention? **European Journal of Cancer**, v. 41, n. 13, p. 1854–1863, set. 2005.

Human papillomavirus and cervical cancer. **OMS**, 2016.

KANG, S. et al. Elevation of cyclooxygenase-2 is related to lymph node metastasis in adenocarcinoma of uterine cervix. **Cancer letters**, v. 237, n. 2, p. 305–11, 18 jun. 2006.

KISS, A. L.; BOTOS, E. Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 7, p. 1228–1237, 2009.

KOLESKE, A. J.; BALTIMORE, D.; LISANTI, M. P. Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. **Proceedings of the National Academy**

of Sciences of the United States of America, v. 92, n. 5, p. 1381–5, 28 fev. 1995.
KULKARNI, S. et al. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 7, n. 2, p. 429–34, fev. 2001.

KWAK, D. H. et al. Relationship between ganglioside expression and anti-cancer effects of the monoclonal antibody against epithelial cell adhesion molecule in colon cancer. **EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE**, v. 43, n. 12, p. 693–701, 2011.

LI, Q. et al. Interleukin-17 Indirectly Promotes M2 Macrophage Differentiation through Stimulation of COX-2/PGE2 Pathway in the Cancer Cells. **Cancer Research and Treatment**, v. 46, n. 3, p. 297–306, 15 jul. 2014.

LI, S.; COUET, J.; LISANTI, M. P. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 46, p. 29182–90, 15 nov. 1996.

LIN, M. et al. Regulation of pancreatic cancer cell migration and invasion by RhoC GTPase and Caveolin-1. **Molecular Cancer** 2005 4:1, v. 4, n. 1, p. 21, 21 jun. 2005.

LIU, B.; QU, L.; YAN, S. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. **Cancer Cell International**, v. 15, p. 106, 2015.

LIU, J. et al. Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 11, p. 7211–22, 14 mar. 1997.

LIU, L. et al. Cavin-1 is essential for the tumor-promoting effect of caveolin-1 and enhances its prognostic potency in pancreatic cancer. **Oncogene**, v. 33, n. 21, p. 2728–2736, 17 maio 2014a.

LIU, P. et al. Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 17, p. 10299–303, 26 abr. 1996.

LIU, Y. et al. Tumor gangliosides accelerate murine tumor angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 17, n. 3, p. 563–571, 2014b.

LORENZON, L. et al. In vivo HPV 16 E5 mRNA: Expression pattern in patients with squamous intra-epithelial lesions of the cervix. **Journal of Clinical Virology**, v. 52, n. 2, p. 79–83, 2011.

MANCHANA, T. et al. Prevalence and prognostic significance of COX-2 expression in stage IB cervical cancer. **Gynecologic oncology**, v. 100, n. 3, p. 556–60, 1 mar. 2006.

MANDIC, A. et al. Cyclooxygenase-2 expression in cervical cancer. **Vojnosanit Pregl**, v. 71, n. 11, p. 997–1005, 2014.

MARTINET, L. et al. PGE2 inhibits natural killer and $\gamma\delta$ T cell cytotoxicity triggered by NKR and TCR through a cAMP-mediated PKA type I-dependent signaling. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 6, p. 838–845, 15 set. 2010.

MCBRIDE, A. A. Replication and partitioning of papillomavirus genomes. **Advances in virus research**, v. 72, p. 155–205, 2008.

MCKALLIP, R.; LI, R.; LADISCH, S. Tumor gangliosides inhibit the tumor-specific immune response. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 163, n. 7, p. 3718–26, 1 out. 1999.

MEYER, C. et al. Distinct role of endocytosis for Smad and non-Smad TGF- β signaling regulation in hepatocytes. **Journal of Hepatology**, v. 55, n. 2, p. 369–378, ago. 2011.

MINEO, C. et al. Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 20, p. 11930–5, 17 maio 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA (ED.). **Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), 2016.

NAGAO, S. et al. Rapid and sensitive detection of physical status of human papillomavirus type 16 DNA by quantitative real-time PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 3, p. 863–7, mar. 2002.

NASIR, A. et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) Expression in Human Endometrial Carcinoma and Precursor Lesions and its Possible Use in Cancer Chemoprevention and Therapy. **in vivo**, v. 21, p. 35–44, 2007.

PARTON, R. G.; SIMONS, K. The multiple faces of caveolae. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 3, p. 185–194, 1 mar. 2007.

PATTERSON, N. A.; SMITH, J. L.; OZBUN, M. A. Human Papillomavirus Type 31b Infection of Human Keratinocytes Does Not Require Heparan Sulfate. **Journal of Virology**, v. 79, n. 11, p. 6838–6847, 1 jun. 2005.

PEREIRA, D. **Anatomia do Sistema Reprodutor Feminino**. Disponível em: <<http://anatomiaemfocobiol2017.blogspot.com/2017/11/1biolcnadenise-anatomia-do-sistema.html>>. Acesso em: 23 out. 2018.

PONATH, P. et al. A Novel, Fully Human Anti-fucosyl-GM1 Antibody Demonstrates Potent *In Vitro* and *In Vivo* Antitumor Activity in Preclinical Models of Small Cell Lung Cancer. **Clinical Cancer Research**, 18 jul. 2018.

PRINETTI, A. et al. GM3 synthase overexpression results in reduced cell motility and in caveolin-1 upregulation in human ovarian carcinoma cells. **Glycobiology**, v. 20, n. 1, p. 62–77, 1 jan. 2010.

PURI. **Textbook of Medical Biochemistry**. [s.l.] Elsevier Health Sciences APAC, 2014.

RADER, J. S. et al. A stratified randomized double-blind phase II trial of celecoxib for treating patients with cervical intraepithelial neoplasia: The potential predictive value of VEGF serum levels: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. **Gynecologic oncology**, v. 145, n. 2, p. 291–297, 2017.

RAIOL, T. et al. Genetic variability and phylogeny of the high-risk HPV-31, -33, -35, -52, and -58 in central Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 81, n. 4, p. 685–692, abr. 2009.

RAZANI, B. et al. Caveolin-1 expression is down-regulated in cells transformed by the human papilloma virus in a p53-dependent manner. Replacement of caveolin-1 expression suppresses HPV-mediated cell transformation. **Biochemistry**, v. 39, n. 45, p. 13916–24, 14 nov. 2000.

RAZANI, B. et al. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 41, p. 38121–38, 12 out. 2001.

SAHAB, Z. et al. Quantitative Measurement of Human Papillomavirus Type 16 E5 Oncoprotein Levels in Epithelial Cell Lines by Mass Spectrometry. **Journal of Virology**, v. 86, n. 17, p. 9465–9473, 2012.

SALES, K. J.; KATZ, A. A. Inflammatory pathways in cervical cancer – the UCT contribution. **South African Medical Journal**, v. 102, n. 6, p. 493–496, 2012.

SANTIBANEZ, J. F. et al. Caveolin-1 interacts and cooperates with the transforming growth factor- β type I receptor ALK1 in endothelial caveolae. **Cardiovascular Research**, v. 77, n. 4, p. 791–799, 1 mar. 2008.

SAPP, M.; BIENKOWSKA-HABA, M. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. **FEBS Journal**, v. 276, n. 24, p. 7206–7216, 2009.

SARKAR, T. R. et al. GD3 synthase regulates epithelial–mesenchymal transition and metastasis in breast cancer. **Oncogene**, v. 34, n. 23, p. 2958–2967, 11 jun. 2015.

SCHILLER, J. T.; DAY, P. M.; KINES, R. C. Current understanding of the mechanism of HPV infection. **Gynecologic Oncology**, v. 118, n. 1 SUPPL. 1, p. S12–S17, 2010.

SEKO, A. et al. Beta 1,3-Galactosyltransferases-4/5 Are Novel Tumor Markers for Gynecological Cancers. **Tumor Biology**, v. 30, n. 1, p. 43–50, 2009.

SELLORS, J. W.; SANKARANARAYANAN, R. **Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical : manual para principiante**. [s.l.] Centro Internacional de Pesquisas sobre o Câncer, 2004.

SEO, S. S. et al. Expression of cyclooxygenase-2 in association with

clinicopathological prognostic factors and molecular markers in epithelial ovarian cancer. **Gynecologic oncology**, v. 92, n. 3, p. 927–35, 1 mar. 2004.

SETIAWATI, A. Celecoxib, a COX-2 Selective Inhibitor, Induces Cell Cycle Arrest at the G2/M Phase in HeLa Cervical Cancer Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, p. 1655–1659, 2016.

SETTAKORN, J. et al. Cyclooxygenase-2 expression in cervical squamous cell carcinoma: the significance of expression in neoplastic cells within the lymphovascular space. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 10, n. 6, p. 1011–4, 2009.

SHATZ, M.; LISCOVITCH, M. Caveolin-1: A tumor-promoting role in human cancer. **International Journal of Radiation Biology**, v. 84, n. 3, p. 177–189, 3 jan. 2008.

SHIRASAWA, H. et al. Transcriptional differences of the human papillomavirus type 16 genome between precancerous lesions and invasive carcinomas. **Journal of virology**, v. 62, n. 3, p. 1022–7, mar. 1988.

SHIRATORI, Y. et al. Inhibition of hepatic metastasis of colon carcinoma by asialo GM1--positive cells in the liver. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 16, n. 2, p. 469–78, ago. 1992.

SILVA NETO, J. DA C. **Citologia Clinica Do Trato Genital Feminino**. Rio de Janeiro: Revinter, 2012.

SIMONS, K.; TOOMRE, D. Lipid rafts and signal transduction. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 1, n. 1, p. 31–39, 1 out. 2000.

SMITH, J. L. et al. Caveolin-1-dependent infectious entry of human papillomavirus type 31 in human keratinocytes proceeds to the endosomal pathway for pH-dependent uncoating. **Journal of virology**, v. 82, n. 19, p. 9505–9512, 2008.

SMITH, J. L.; CAMPOS, S. K.; OZBUN, M. A. Human papillomavirus type 31 uses a caveolin 1- and dynamin 2-mediated entry pathway for infection of human keratinocytes. **Journal of virology**, v. 81, n. 18, p. 9922–31, set. 2007.

STAN, R. V. “Caveolae” Review Series. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 11, n. 1, p. 4–5, jan. 2007.

SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, A. J. Cyclooxygenase-2 Transcription Is Regulated by Human Papillomavirus 16 E6 and E7 Oncoproteins: Evidence of a Corepressor/Coactivator Exchange. **Cancer Research**, v. 67, n. 8, p. 3976–3985, 15 abr. 2007.

SUPRYNOWICZ, F. A et al. HPV-16 E5 oncoprotein upregulates lipid raft components caveolin-1 and ganglioside GM1 at the plasma membrane of cervical cells. **Oncogene**, v. 27, n. 8, p. 1071–1078, 2008.

SUPRYNOWICZ, F. A et al. The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein

inhibits epidermal growth factor trafficking independently of endosome acidification. **Journal of virology**, v. 84, n. 20, p. 10619–10629, 2010.

SYRJÄNEN, S. Oral manifestations of human papillomavirus infections. **European journal of oral sciences**, p. 49–66, 2018.

TANAKA, K. et al. Enhanced expression of unique gangliosides with GM2-determinant in human uterine cervical carcinoma-derived cell lines. **Glycoconjugate Journal**, v. 33, n. 5, p. 745–754, 6 out. 2016.

THOMAS, C. M.; SMART, E. J. Caveolae structure and function. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 3, p. 796–809, jun. 2008.

THOMPSON, T. C. et al. The role of caveolin-1 in prostate cancer: clinical implications. **Prostate cancer and prostatic diseases**, v. 13, n. 1, p. 6–11, mar. 2010.

TILBORGHS, S. et al. The role of Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer. 2017.

TJIONG, M. Y. et al. Increased IL-6 and IL-8 Levels in Cervicovaginal Secretions of Patients with Cervical Cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 73, n. 2, p. 285–291, maio 1999.

TORRES, V. A. et al. Caveolin-1 controls cell proliferation and cell death by suppressing expression of the inhibitor of apoptosis protein survivin. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 9, p. 1812–1823, 1 maio 2006.

VAN SLAMBROUCK, S. et al. Carbohydrate-to-carbohydrate interactions between α 2,3-linked sialic acids on α 2 integrin subunits and asialo-GM1 underlie the bone metastatic behaviour of LNCAP-derivative C4-2B prostate cancer cells. **Bioscience Reports**, v. 34, n. 5, p. 546–557, 17 set. 2014.

VENUTI, A. et al. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. **Molecular Cancer**, v. 10, n. 1, p. 140, 2011.

VICI, P. et al. Emerging biological treatments for uterine cervical carcinoma. **Journal of Cancer**, v. 5, n. 2, p. 86–97, 2014.

VIRCHOW, R.; REIZUNG; REIZBARKEIT. No Title. **Arch Pathol Anat Klin Med**, v. 14, p. 1–63, 1858.

VOGEL, C.-A. et al. Carcinoembryonic antigen expression, antibody localisation and immunophotodetection of human colon cancer liver metastases in nude mice: A model for radioimmunotherapy. **International Journal of Cancer**, v. 67, n. 2, p. 294–302, 17 jul. 1996.

WILLIAMS, T. M.; LISANTI, M. P. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 288, p. 494–506, 2005.

WITKIEWICZ, A. K. et al. An Absence of Stromal Caveolin-1 Expression Predicts Early Tumor Recurrence and Poor Clinical Outcome in Human Breast Cancers. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 6, p. 2023–2034, jun. 2009.

WOODBYP, B.; SCOTT, M.; BODILY, J. The Interaction Between Human Papillomaviruses and the Stromal Microenvironment. In: **Progress in molecular biology and translational science**. [s.l: s.n.]. v. 144p. 169–238, 2016.

XIA, Y.; SHEN, S.; VERMA, I. M. NF- κ B, an active player in human cancers. **Cancer immunology research**, v. 2, n. 9, p. 823–30, set. 2014.

YANG, G. et al. Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 4, n. 8, p. 1873–80, ago. 1998.

YU, R. K. et al. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides--an overview. **Journal of oleo science**, v. 60, n. 10, p. 537–44, 2011.

ZHUO, D.; LI, X.; GUAN, F. Biological Roles of Aberrantly Expressed Glycosphingolipids and Related Enzymes in Human Cancer Development and Progression. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1–9, 2018.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 260–265, 20 fev. 2009.

APÊNDICE A – PRIMERS E VALIDAÇÃO

Um conjunto de 17 pares de *primers*, além dos 2 pares para os genes de referência (GAPDH e ACTB), foram utilizados no estudo e suas sequências e características (temperatura de anelamento e comprimento do *amplicon* gerado) podem ser vistas na tabela VIII. A confecção e validação desse conjunto de primers possibilitou a criação de uma plataforma para genotipagem e execução de métodos para mensuração da expressão gênica (qPCR) de oncogenes pertencentes aos mais importantes HPVs de alto risco encontrados no estado e na região Nordeste do país. Alguns genes alvos dos efeitos provocados pela atividade desses oncogenes também foram avaliados.

Validação dos pares de *primers* GAPDH e ACTB

Curva de eficiência do par GAPDH

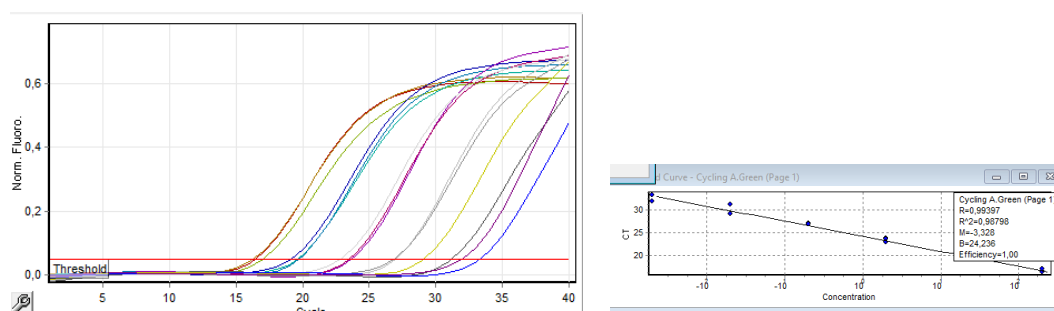


Figura 34. Gráfico de amplificação e curva de eficiência do par GAPDH.

Curva de eficiência do par ACTB

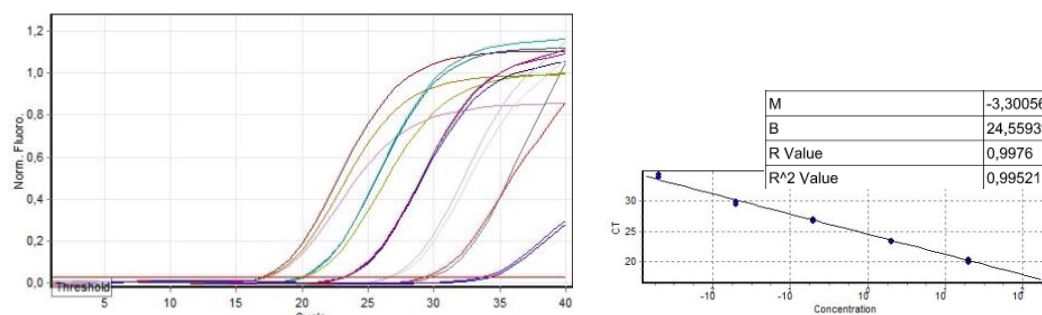


Figura 35. Gráfico de amplificação e curva de eficiência do ACTB.

Validação dos pares de *primers* de E5 e E6 do HPV16

Curva de eficiência do par E5 HPV16

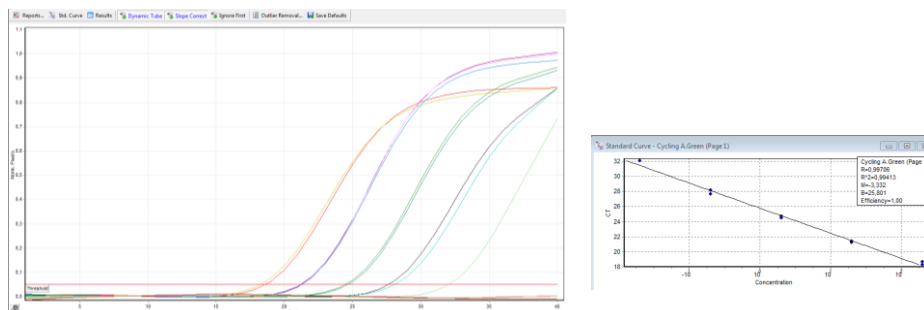


Figura 36. Gráfico de amplificação e curva de eficiência do E5 HPV16.

Testes de cruzamentos e sequenciamento do par 49 (E6.HPV16)

O par 49 foi utilizado para realização de uma PCR com amostras positivas para outros genótipos (18, 31, 33 e 58), além de um controle positivo (genoma do HPV16 purificado de clonagem) e um negativo. Por meio da figura x abaixo pode-se verificar que não houve cruzamento deste par com outros genótipos, somente surgindo a banda relativa ao *amplicon* no poço da amostra positiva (G16). PCRs com *primers* para cada genótipo testado foram realizadas com as mesmas amostras utilizadas para o par 49 testado para validação do experimento e as bandas podem ser vistas nos poços "par 41", "par 1", "par 13" e "par 20".

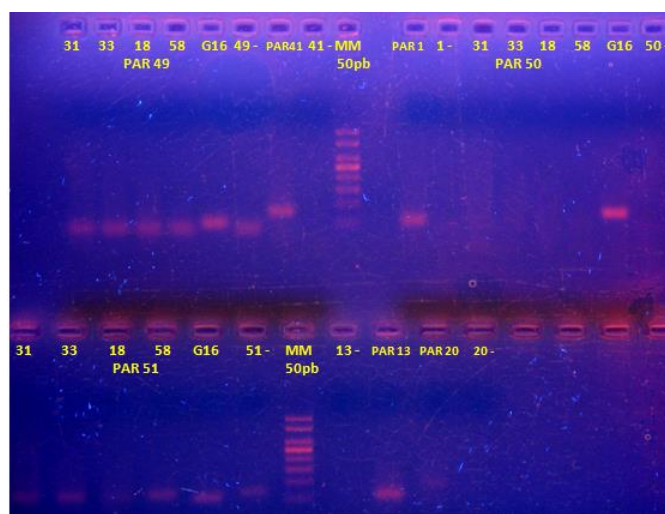


Figura 37. Gel de agarose 2% resultado de eletroforese a 80V por 35 minutos. As mesmas amostras positivas para os genótipos 18, 31, 33 e 58 foram utilizadas para o par 49 e os pares 41, 1, 13 e 20 (todos amplificam regiões do oncogene E5 dos HPVs, 31, 33, 18 e 58 respectivamente).

Curva de eficiência do par 49

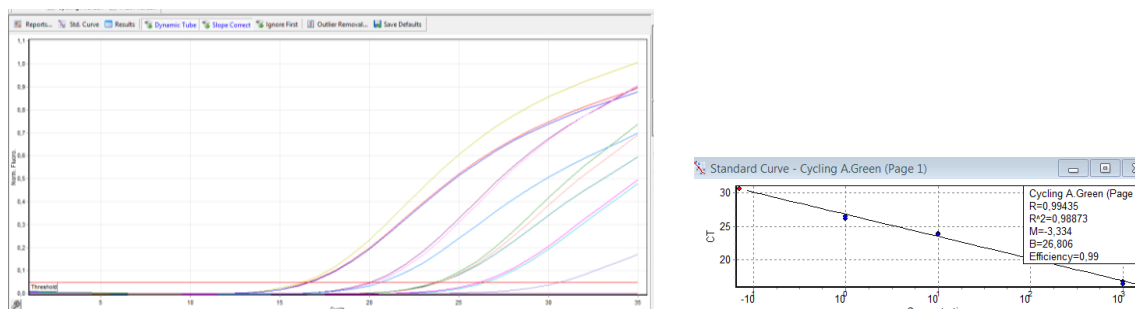


Figura 38. Gráfico de amplificação e curva de eficiência do par 49.

Validação dos pares de *primers* de E5, E6 e E7 do HPV31 (pares 41, 34 e 44 respectivamente)

Curva de eficiência do par 41

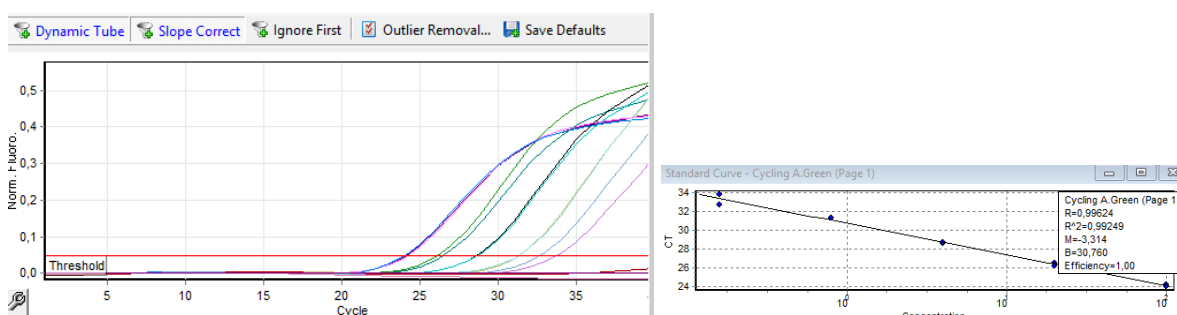


Figura 39. Gráfico de amplificação e curva de eficiência do par 41.

Curva de eficiência do par 34

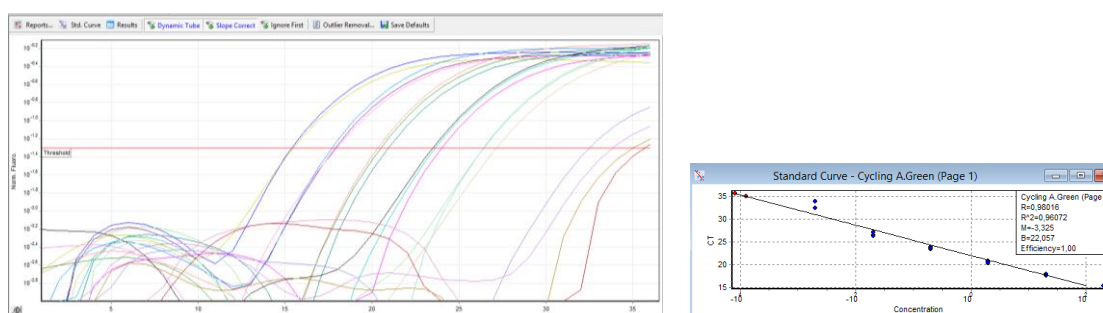


Figura 40. Gráfico de amplificação e curva de eficiência do par 34.

7.1.1.1 Curva de eficiência do par 44

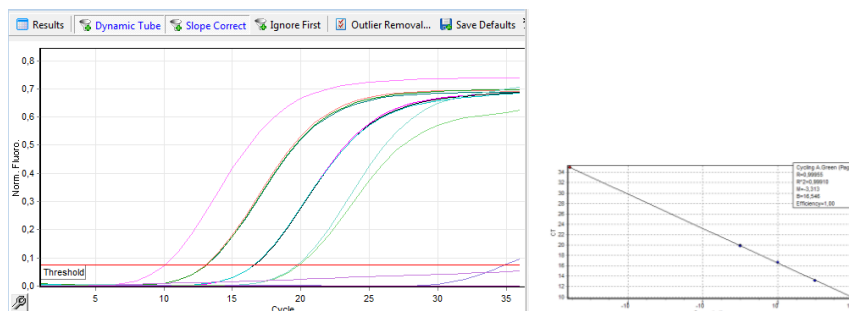


Figura 41. Gráfico de amplificação e curva de eficiência do par 44.

7.1.2 Validação dos pares de *primers* de E5, E6 e E7 do HPV58 (pares 20, 21 e 22 respectivamente)

Testes de cruzamento do par 20

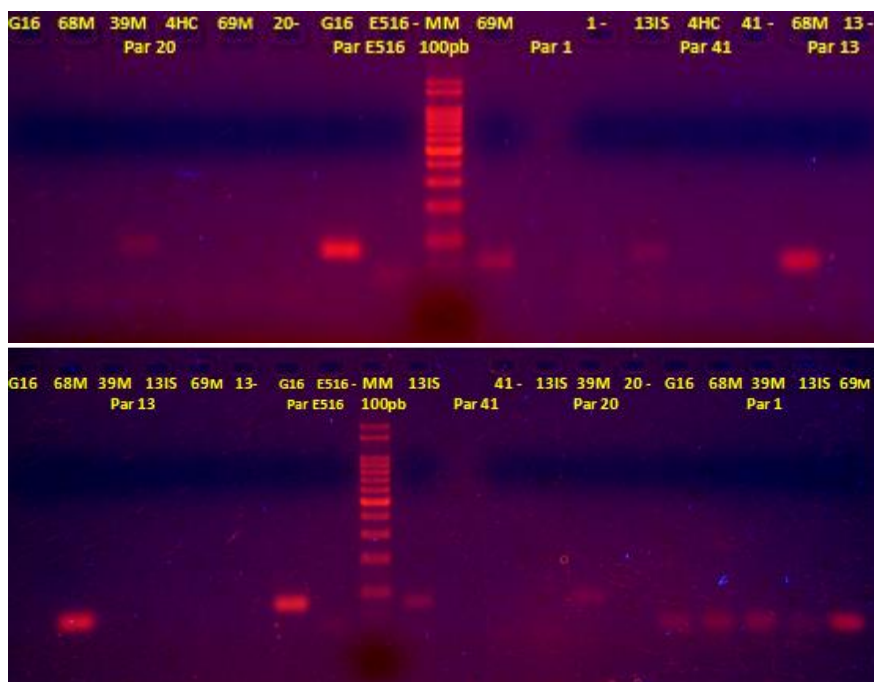


Figura 42. Gel de agarose 2% resultado de eletroforese a 80V por 35 minutos.

Curva de eficiência do par 20

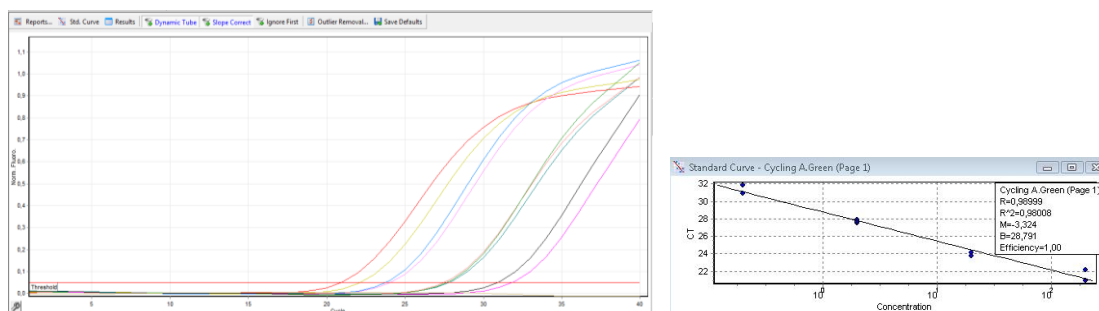


Figura 43. Gráfico de amplificação e curva de eficiência do par 20.

Curva de eficiência do par 21

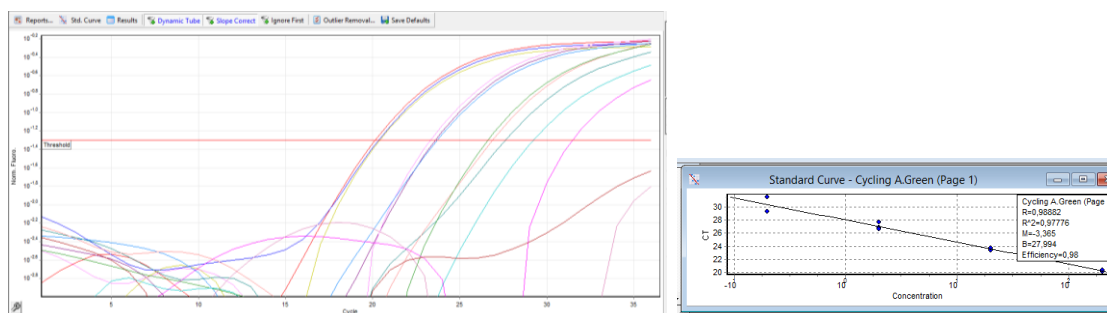


Figura 44. Gráfico de amplificação e curva de eficiência do par 21.

Curva de eficiência do par 22

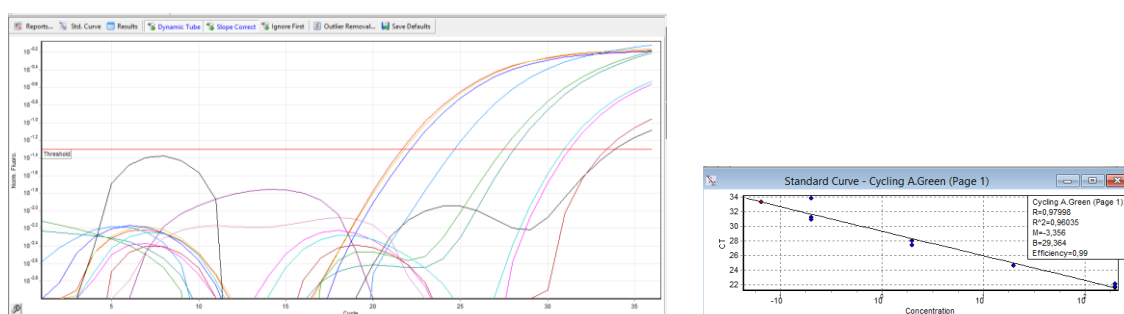


Figura 45. Gráfico de amplificação e curva de eficiência do par 22.

Validação dos pares de *primers* de E5, E6 e E7 do HPV18 (pares 13, 17 e 18 respectivamente)

Curva de eficiência do par 13

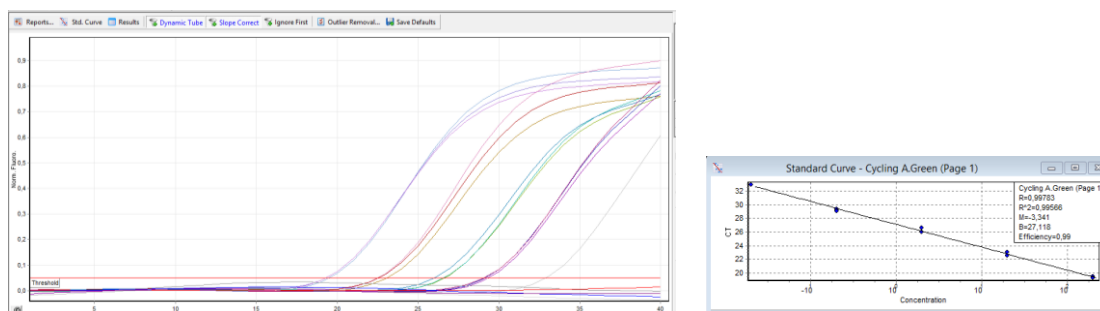


Figura 46. Gráfico de amplificação e curva de eficiência do par 13.

Curva de eficiência do par 17

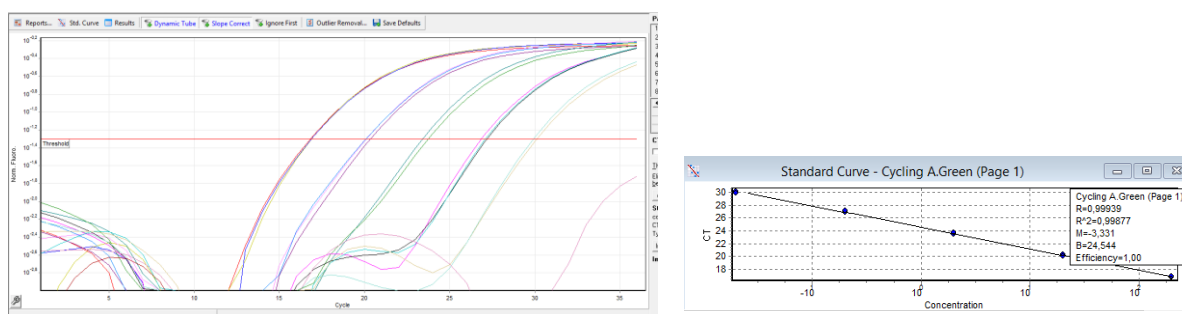


Figura 47. Gráfico de amplificação e curva de eficiência do par 17.

Curva de eficiência do par 18

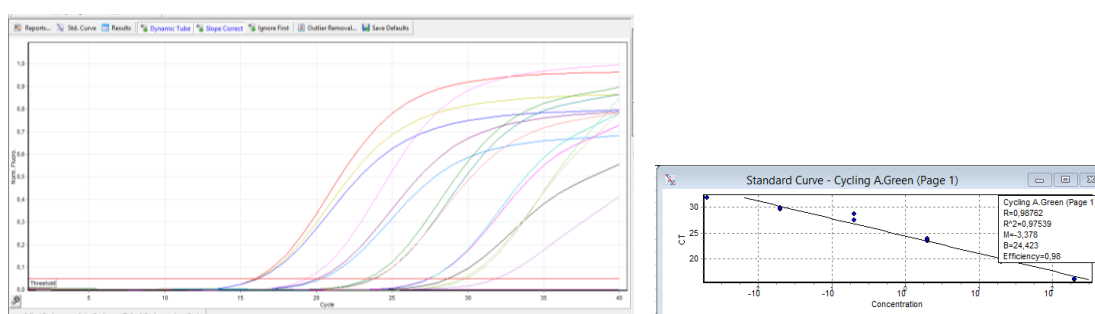


Figura 48. Gráfico de amplificação e curva de eficiência do par 18.

Validação dos pares de *primers* de E5, E6 e E7 do HPV33 (pares 1, 4 e 5 respectivamente)

Curva de eficiência do par 1

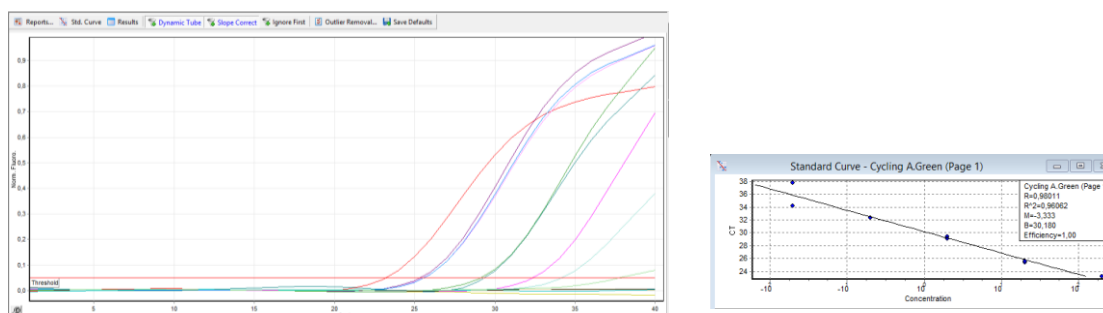


Figura 49. Gráfico de amplificação e curva de eficiência do par 1.

Curva de eficiência do par 4

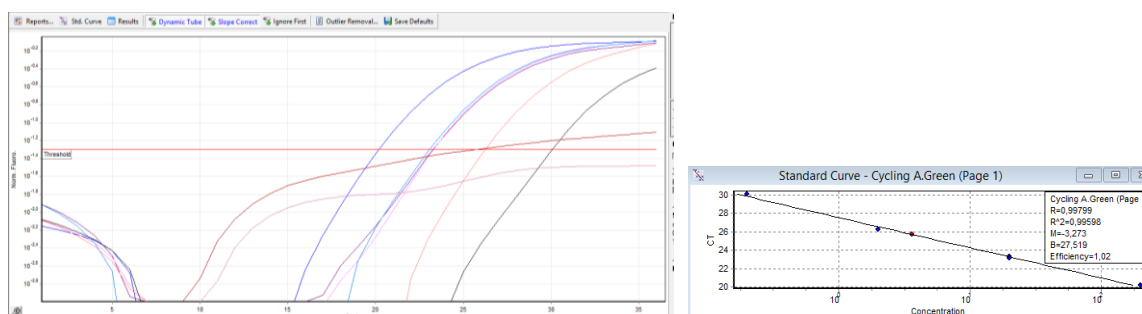


Figura 50. Gráfico de amplificação e curva de eficiência do par 4.

Curva de eficiência do par 5

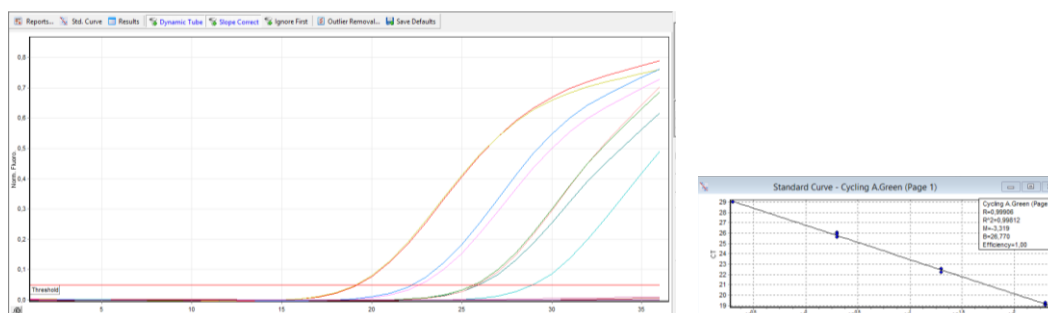


Figura 51. Gráfico de amplificação e curva de eficiência do par 5.

Validação do par de *primer* da Caveolina-1 (par Cav1_2)

Curva de eficiência do par Cav1_2

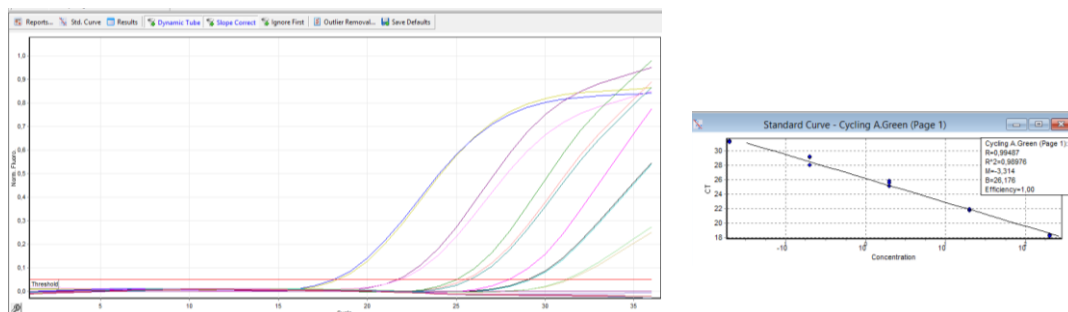


Figura 52. Gráfico de amplificação e curva de eficiência do par Cav1_2.

Validação do par de *primer* do Gangliosídeo-1 (par GM1_4)

Curva de eficiência do par GM1_4

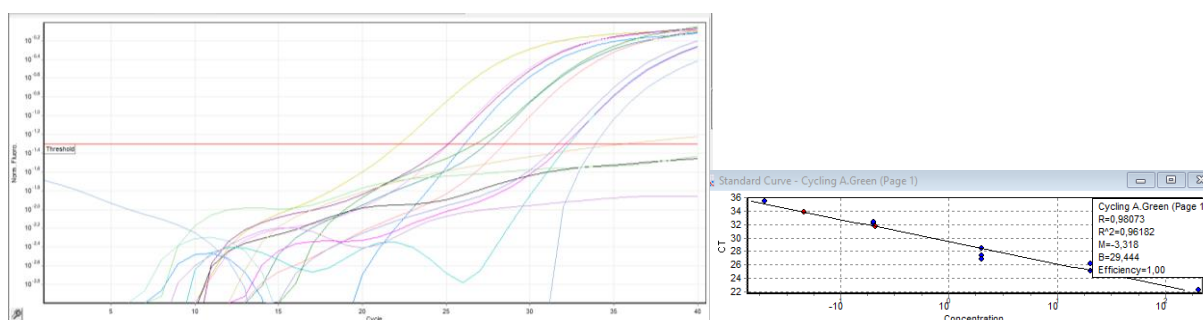


Figura 53. Gráfico de amplificação e curva de eficiência do par GM1_4.

Validação do par de *primer* de COX-2 (par COX2_6)

Curva de eficiência do par COX2_6

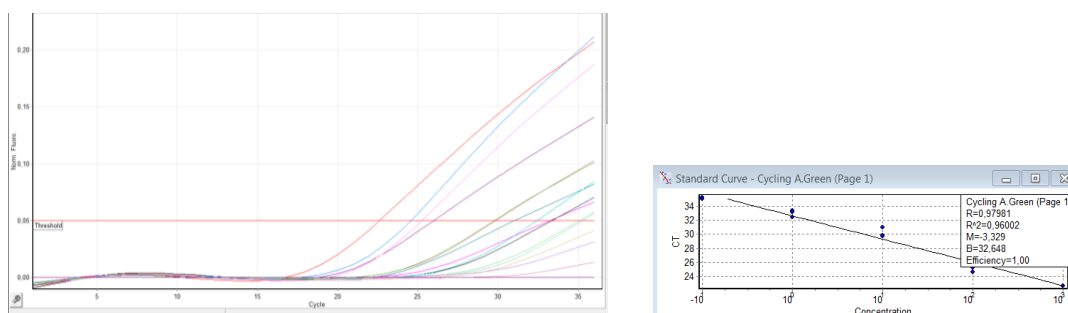


Figura 54. Gráfico de amplificação e curva de eficiência do par COX2_6.

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS****DEPARTAMENTO DE GENÉTICA****TERMO DE CONCENTIMENTO 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: _____

ANEXO A – PUBLICAÇÕES PRODUZIDAS DURANTE O DOUTORADO

Activities of stromal and immune cells in HPV-related cancers

Barros et al. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* (2018) 37:137
<https://doi.org/10.1186/s13046-018-0802-7>

Journal of Experimental &
Clinical Cancer Research

REVIEW

Open Access

Activities of stromal and immune cells in HPV-related cancers



Marconi Rego Barros Jr¹, Cristiane Moutinho Lagos de Melo², Maria Luiza Carneiro Moura Gonçalves Rego Barros³, Rita de Cássia Pereira de Lima¹, Antonio Carlos de Freitas^{1†} and Aldo Venuti^{4†}

Abstract

The immune system is composed of immune as well as non-immune cells. As this system is a well-established component of human papillomavirus- (HPV)-related carcinogenesis, high risk human papillomavirus (hrHPV) prevents its routes and mechanisms in order to cause the persistence of infection. Among these mechanisms are those originated from stromal cells, which include the cancer-associated fibroblasts (CAFs), the myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and the host infected cells themselves, i.e. the keratinocytes. These types of cells play central role since they modulate immune cells activities to create a prosperous milieu for cancer development, and the knowledge how such interactions occur are essential for prognostic assessment and development of preventive and therapeutic approaches. Nevertheless, the precise mechanisms are not completely understood, and this lack of knowledge precluded the development of entirely efficient immunotherapeutic strategies for HPV-associated tumors. As a result, an intense work for attaining how host immune response works, and developing of effective therapies has been applied in the last decade. Based on this, this review aims to discuss the major mechanisms of immune and non-immune cells modulated by hrHPV and the potential and existing immunotherapies involving such mechanisms in HPV-related cancers. It is noticed that the combination of immunotherapies has been demonstrated to be essential for obtaining better results, especially because the possibility of increasing the modulating capacity of the HPV-tumor microenvironment has been shown to be central in strengthening the host immune system.

Keywords: HPV-related cancer, Innate immune response, Cancer-associated fibroblasts (CAFs), Myeloid-derived suppressor cell (MDSC), Macrophages, Neutrophils, Natural killer cells, Immune evasion, Immunotherapy

Viral modulation of TLRs and cytokines and the related immunotherapies for HPV-associated cancers

Review Article

Viral Modulation of TLRs and Cytokines and the Related Immunotherapies for HPV-Associated Cancers

Marconi Rego Barros Jr ¹, Talita Helena Araújo de Oliveira,¹
Cristiane Moutinho Lagos de Melo ², Aldo Venuti ^{3,4} and Antonio Carlos de Freitas ¹

¹Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy (LEMTE), Department of Genetics, Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Av. Prof Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária 50670-901 Recife, PE, Brazil

²Laboratory of Immunological and Antitumor Analysis (LAIA), Department of Antibiotics, Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Av. Prof Artur de Sá, s/n, Cidade Universitária 50740-525 Recife, PE, Brazil

³Tumor Immunology and Immunotherapy Unit, Department of Research, Advanced Diagnostic and Technological Innovation, Regina Elena National Cancer Institute, Via Elio Chianesi 53, 00144 Roma, Italy

⁴HPV-Unit, UOSD Tumor Immunology and Immunotherapy, Regina Elena National Cancer Institute, Via Elio Chianesi 53, 00144 Roma, Italy

Correspondence should be addressed to Aldo Venuti; aldo.venuti@ifp.gov.it
and Antonio Carlos de Freitas; acf_ufpe@yahoo.com.br

Received 18 December 2017; Accepted 26 March 2018; Published 2 May 2018

Academic Editor: Andréia M. Cardoso

Copyright © 2018 Marconi Rego Barros Jr et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The modulation of the host innate immune system is a well-established carcinogenesis feature of several tumors, including human papillomavirus- (HPV-) related cancers. This virus is able to interrupt the initial events of the immune response, including the expression of Toll-like receptors (TLRs), cytokines, and inflammation. Both TLRs and cytokines play a central role in HPV recognition, cell maturation and differentiation as well as immune signalling. Therefore, the imbalance of this sensitive control of the immune response is a key factor for developing immunotherapies, which strengthen the host immune system to accomplish an efficient defence against HPV and HPV-infected cells. Based on this, the review is aimed at exposing the HPV immune evasion mechanisms involving TLRs and cytokines and at discussing existing and potential immunotherapeutic TLR- and cytokine-related tools.

hrHPV E5 oncoprotein: immune evasion and related immunotherapies

de Freitas et al. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* (2017) 36:71
DOI 10.1186/s13046-017-0541-1

Journal of Experimental &
Clinical Cancer Research

REVIEW

Open Access



hrHPV E5 oncoprotein: immune evasion and related immunotherapies

Antonio Carlos de Freitas^{1*}, Talita Helena Araújo de Oliveira¹, Marconi Rego Barros Jr.¹ and Aldo Venuti^{2*} 

Abstract

The immune response is a key factor in the fight against HPV infection and related cancers, and thus, HPV is able to promote immune evasion through the expression of oncogenes. In particular, the E5 oncogene is responsible for modulation of several immune mechanisms, including antigen presentation and inflammatory pathways. Moreover, E5 was suggested as a promising therapeutic target, since there is still no effective medical therapy for the treatment of HPV-related pre-neoplasia and cancer. Indeed, several studies have shown good prospective for E5 immunotherapy, suggesting that it could be applied for the treatment of pre-cancerous lesions. Thus, insofar as the majority of cervical, oropharyngeal and anal cancers are caused by high-risk HPV (hrHPV), mainly by HPV16, the aim of this review is to discuss the immune pathways interfered by E5 oncoprotein of hrHPV highlighting the various aspects of the potential immunotherapeutic approaches.

Keywords: Human Papillomavirus, HPV-related cancer, E5 oncoprotein, Immune response modulation, HPV immune evasion, Immunotherapy

Expression profile of microRNA-203 and its Δ Np63 target in cervical carcinogenesis: prospects for cervical cancer screening

ANTICANCER RESEARCH 36: 3839-3846 (2016)

Expression Profile of *MicroRNA-203* and its Δ Np63 Target in Cervical Carcinogenesis: Prospects for Cervical Cancer Screening

ELIANE CAMPOS COIMBRA^{1,2}, MARIA DA CONCEIÇÃO GOMES LEITÃO²,
MARCONI REGO BARROS JÚNIOR², TALITA HELENA ARAÚJO DE OLIVEIRA²,
JACINTO DA COSTA SILVA NETO³ and ANTONIO CARLOS DE FREITAS²

¹Biological Sciences Institute (ICB), University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil;

²Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy (LEMTE), Department of Genetics,
Center for Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil;

³Molecular and Cytological Research Laboratory, Department of Histology,
Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil

Abstract. *Background/Aim:* Host molecules disturbed by human papillomavirus (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, Δ Np63, are known to be host molecules that interact with each other to control the proliferation and differentiation of keratinocytes; both have been found to be dysregulated in many cancers. As the role of p63 and miR-203 in cervical carcinogenesis is not yet well-understood, we have, thus, decided to evaluate the changes of expression of both in cervical carcinogenesis. *Materials and Methods:* This study was carried out by obtaining quantitative polymerase chain reaction (qPCR) data from cervical biopsies. *Results:*

miR-203 and Δ Np63 displayed a similar expression pattern across cervical tissues and both targets showed statistically significant differences between low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) x high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL); HSIL x Cancer. Additionally, we did not observe an inverse correlation between Δ Np63 mRNA and miR-203 levels as expected but, rather, a positive correlation between cervical tissues. *Conclusion:* Although preliminary, the expression levels of Δ Np63 mRNA and miR-203 seem to be promising for cervical cancer screening. In addition, positive correlation between miR-203 and Δ Np63 expression suggests the possible existence of some indirect pathways. However, further studies are needed to clarify the role of Δ Np63 and miR-203 in cervical carcinogenesis and, thus, determine how they can be applied in new strategies for diagnosis.

Livro: "Reação em cadeia da polimerase (PCR): princípio e orientações sobre otimização", 69p, UFPE.

1ª Edição 2018

Catálogo na fonte

Bibliotecária: Kalina Lígia França da Silva, CRB4-1748

B277r Barros Júnior, Marconi Rego.
 Reação em cadeia da polimerase (PCR) : princípio e orientações
 sobre otimização / Marconi Rego Barros Júnior, Maria Luiza Carneiro
 Moura Gonçalves Rego Barros. – Recife : Ed. UFPE, 2018.
 69 p. : il.

 Possui colaboradores.
 Inclui referências.
 ISBN 978-85-415-1016-5 (broch.)

 1. Biotecnologia. 2. Reação em cadeia de polimerase. 3. Biologia
 molecular. 4. Genética. 5. Bioquímica. I. Barros, Maria Luiza Carneiro
 Moura Gonçalves Rego. II. Título.

660.6 CDD (23.ed.) UFPE (BC2018-037)



Rua Acadêmico Hélio Ramos, 20, Várzea
 Recife, PE | CEP: 50.740-530
 Fone: (0xx81) 2126.8397 | Fax: (0xx81) 2126.8395
www.ufpe.br/edufpe | livraria@edufpe.com.br

Todos os direitos reservados aos organizadores: *Proibida a reprodução total ou parcial, por qualquer meio ou processo, especialmente por sistemas gráficos, microfilmicos, fotográficos, reprográficos, fonográficos e videográficos. Vedada a memorização e/ou a recuperação total ou parcial em qualquer sistema de processamento de dados e a inclusão de qualquer parte da obra em qualquer programa juscibernético. Essas proibições aplicam-se também às características gráficas da obra e à sua editoração.*