

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**ESCOLA DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**NAYARA NASCIMENTO TOLEDO SILVA**

**POLIMORFISMO C677T NO GENE DA ENZIMA METILENOTETRAHIDROFOLATO  
REDUTASE E O RISCO DE DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER CERVICAL**

Ouro Preto

2015

**NAYARA NASCIMENTO TOLEDO SILVA**

**POLIMORFISMO C677T NO GENE DA ENZIMA METILENOTETRAHIDROFOLATO  
REDUTASE E O RISCO DE DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER CERVICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte das exigências para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Alves Lima

Ouro Preto

2015

S586p

Silva, Nayara Nascimento Toledo.

Polimorfismo C677T no gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase e o risco de desenvolvimento do câncer cervical [manuscrito] / Nayara Nascimento Toledo Silva. - 2015.

70f.: il.: color; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Alves Lima.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Farmácia, Análises Clínicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (CiPharma).

Área de Concentração: .

1. Câncer cervical. 2. Epidemiologia molecular. I. Lima, Angélica Alves. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 618.14-006

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)



UFOP  
Universidade Federal  
de Ouro Preto



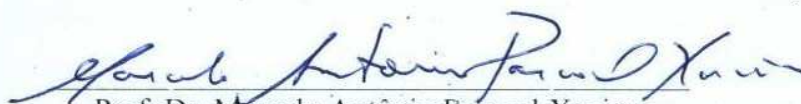
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP  
Escola de Farmácia

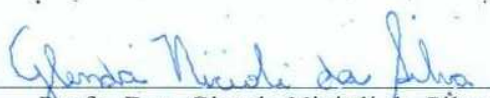


ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 96ª DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA ESCOLA DE  
FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

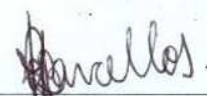
1 Aos vinte e sete dias do mês de março de dois mil e quinze, sexta-feira, realizou-se, a  
2 partir das dez horas, no Auditório da Escola de Farmácia, Campus UFOP, a sessão de  
3 defesa de dissertação da candidata ao grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas,  
4 Nayara Nascimento Toledo Silva intitulada: “Polimorfismo C677T no gene da enzima  
5 metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) e o risco de desenvolvimento do câncer  
6 cervical”. A Banca Examinadora foi constituída pelo Prof. Dr. Marcelo Antônio  
7 Pascoal Xavier (UFMG), Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva (UFOP), e pela  
8 orientadora Profa. Dra. Angélica Alves Lima. De acordo com o regulamento do Curso,  
9 a orientadora, Profa. Dra. Angélica Alves Lima, presidente da banca, abriu a sessão,  
10 passando a palavra à candidata, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi  
11 realizada a arguição pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva  
12 defesa da candidata. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença  
13 da candidata, tendo deliberado pela sua Aprovação. Nada mais havendo para constar,  
14 lavrou-se a presente ata por mim, Maria das Mercês Fortes da Silva Miranda, secretária  
15 do CiPharma, e fez-se a leitura da presente ata que segue assinada pelos membros da  
16 Banca Examinadora e pela Coordenadora do Curso.

Ouro Preto, 27 de março de 2015.

21   
22 Prof. Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier  
23 UFMG

25   
26 Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva  
27 UFOP

31   
32 Profa. Dra. Angélica Alves Lima

35   
36 Profa. Dra. Neila Márcia Silva Barcellos  
37 Coordenadora do programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas  
38

*Dedico este trabalho aos meus pais, Valério e Maria José,  
e à minha irmã, Nayane, por serem meus pilares  
e a razão para que eu chegasse até aqui.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora Aparecida por sempre iluminarem meus caminhos e guiarem meus passos.

Aos meus pais pelo amor e apoio incondicionais, e pelo exemplo de dedicação e esforço. À minha irmã pela amizade, preocupação e por me ensinar a enxergar as coisas de um modo mais leve.

Ao Flávio pelo companheirismo, amor e incentivo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Angélica Alves Lima, por todo aprendizado, pelo exemplo de integridade e ética, pela confiança, dedicação, paciência e amizade.

À Priscila Mayrink de Miranda, minha eterna dupla, e à Bruna Caroline Vieira Pitol pelo apoio e amizade.

A todos do Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC), em especial ao Prof. Dr. Roney Luiz de Carvalho Nicolato, pelo incentivo e por tornarem minhas manhãs mais alegres.

Ao Laboratório de Imunopatologia (LIMP) e ao Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC), em especial ao Me. Levi Eduardo Soares Reis, pela solicitude e prontidão em me ajudar.

A Prof. Dra. Cláudia Martins Carneiro e a toda equipe do setor de Citologia do LAPAC, ao Dr. Alexandre Tafuri e ao Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino, pela colaboração e disponibilidade na realização deste projeto.

A todos os integrantes do grupo de Pesquisa AMBAR, em especial às alunas Bárbara Letícia Gonçalves de Assis, Lenita Amanda Ribas e Paula Soares dos Santos.

Às equipes dos PSFs de Ouro Preto, especialmente enfermeiros(as) e assistentes comunitárias de saúde.

Às mulheres que aceitaram participar deste projeto, peças fundamentais para a realização do mesmo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Cipharma).

Ao CNPq, FAPEMIG e UFOP pelo financiamento e apoio.

*Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar  
uma alma humana, seja apenas outra alma humana.*

*Carl Jung*

## RESUMO

A Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR) é uma enzima que atua no metabolismo do folato e polimorfismos em seu gene vêm sendo associados de maneira controversa ao desenvolvimento do câncer cervical. Esta neoplasia, causada principalmente pela infecção persistente pelo Papilomavírus Humano (HPV), possui altas taxas de prevalência e mortalidade na população feminina. Neste trabalho, a pesquisa de HPV nas amostras histológicas foi realizada por Imuno-histoquímica e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os iniciadores SPF e GP5+/GP6+. O polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR foi analisado por PCR seguida de digestão enzimática (RFLP) utilizando eletroforese em gel de agarose, em gel de poli-acrilamida e eletroforese capilar. Após a definição da metodologia mais adequada para a detecção viral e a avaliação desse polimorfismo no material parafinado, as análises foram realizadas em 240 amostras, sendo 120 do grupo controle e 120 casos. A frequência dos genótipos da MTHFR na amostragem foi de 64% CC, 31% CT e 5% TT. Associação estatisticamente significativa foi encontrada entre o polimorfismo C677T da MTHFR e a presença de lesões intraepiteliais cervicais/carcinoma epidermoide invasor, sendo que o alelo T foi observado em 33,1% do grupo controle e em apenas 21,6% dos casos ( $p=0,023$ ). A avaliação de risco (*Odds ratio* – OR) sugeriu que a presença do alelo polimórfico pode agir com um fator de proteção para lesões cervicais (OR: 0,557; IC95% 0,355-0,925;  $p=0,024$ ). Resultados similares foram encontrados no grupo com faixa etária superior a 30 anos. Por outro lado, não foi observada associação estatisticamente significativa entre a infecção viral e o polimorfismo C677T da MTHFR. Assim, pode-se concluir que mulheres com o polimorfismo C677T no gene da MTHFR possuem um risco menor de apresentarem lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da cérvix uterina.



**ABSTRACT**

The Methylene tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) is an enzyme that acts in folate metabolism and gene polymorphisms have been associated in a controversial way to the development of cervical cancer. This neoplasia, mainly caused by persistent infection by Human Papillomavirus (HPV), has high prevalence and mortality rates in the female population. In this work, the detection of HPV in histological samples was performed by Immunohistochemistry and PCR with primers SPF and GP5+/GP6+. The C677T polymorphism in the MTHFR gene was analyzed by PCR/RFLP using electrophoresis in agarose gel, polyacrylamide gel and capillary electrophoresis. After defining the most appropriate methodology for viral detection and evaluation of this polymorphism in paraffin material, the analyses were performed with 240 samples, 120 in the control group and 120 cases. The frequency of MTHFR genotypes in the sample was 64% CC, 31% CT and 5% TT. Statistically significant association was found between MTHFR polymorphism and the presence of cervical intraepithelial lesions/invasive squamous cell carcinoma, and the T allele was observed in 33.1% of the control group and only 21.6% of cases ( $p=0.023$ ). Risk assessment (Odds Ratio - OR) suggested that the presence of polymorphic allele may act with a protective factor for cervical lesions (OR: 0,557; IC95% 0,355-0,925;  $p=0,024$ ). Similar results were observed in the group over 30 years old. However, there was no statistically significant association between viral infection and the C677T MTHFR polymorphism. Thus, it can be concluded that women with the MTHFR C677T polymorphism have a lower risk of developing neoplastic and preneoplastic lesions of the uterine cervix.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Genoma do HPV.....	16
Figura 2: Mecanismo de infecção por HPV.....	19
Figura 3: Ações das oncoproteínas E6 e E7 na imortalização celular .....	20
Figura 4: Metabolismo do folato.....	23
Figura 5: Desenho do estudo.....	28
Figura 6: Géis de agarose representativos das amostras amplificadas por PCR utilizando os iniciadores GP5+/GP6+, SPF e MY09/MY11 .....	32
Figura 7: Géis representativos de amostras amplificadas por PCR e digeridas com <i>Hinf I</i> (RFLP) .	33
Figura 8: Eletroforese capilar.....	34
Figura 9: Frequência dos genótipos da enzima MTHFR .....	38

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Classificação dos tipos de HPV de acordo com o risco oncogênico.....	18
TABELA 2: Sistema de classificação das lesões cervicais.....	25
TABELA 3: Sequência dos iniciadores utilizados para detecção do HPV.....	30
TABELA 4: Quantidade de reagentes utilizados no protocolo de PCR para pesquisa de HPV.....	31
TABELA 5: Protocolo de PCR para pesquisa de HPV no Termociclador NyxTechnik.....	31
TABELA 6: Concordância positiva entre as metodologias PCR (GP5+/GP6+), PCR (SPF) e IHQ relacionadas ao resultado histopatológicos e à idade.....	35
TABELA 7: Análise da concordância e discordância entre as técnicas para detecção do HPV: PCR (SPF), PCR (GP5+/GP6+) e IHQ.....	36
TABELA 8: Desempenho dos testes IHQ e PCR para pesquisa de HPV nas amostras histológicas.....	36
TABELA 9: Concordância e discordância dos resultados do genótipo da MTHFR obtidos com EC, EA e EP.....	37
TABELA 10: Associação entre o genótipo da MTHFR e a infecção por HPV.....	38
TABELA 11: Frequência genotípica e alélica da enzima MTHFR em relação às lesões no colo uterino e o risco de desenvolvimento do câncer cervical.....	39
TABELA 12: Risco de desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas na cérvix uterina de acordo com o polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR.....	39
TABELA 13: Associação entre o genótipo da enzima MTHFR e a gravidade da lesão cervical.....	39
TABELA 14: Associação entre o genótipo da enzima MTHFR e a presença de lesões cervicais de acordo com a idade.....	40
TABELA 15: Risco de desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas na cérvix uterina de acordo com o polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR em mulheres com idade >30 anos.....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIS:** Adenocarcinoma *in situ*
- ASC-H:** *Atypical Squamous Cells can not exclude HSIL* (Células Escamosas Atípicas em que não se pode excluir lesão de alto grau)
- ASC-US:** *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance* (Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado)
- BPV:** *Bovine Papillomavirus* (Papilomavírus Bovino)
- CBS:** Cistationina  $\beta$ -Sintase
- cdk:** *cyclin-dependent kinase* (quinase ciclina- dependente)
- CEI:** Carcinoma Epidermoide Invasor
- COPV:** *Canine Oral Papillomavirus* (Papilomavírus Oral Canino)
- DHF:** Dihidrofolato
- dNTP:** Desoxinucleotídeo trifosfato
- dTMP:** Desoxitimidina monofosfato
- dUMP:** Desoxiuridina monofosfato
- EcPV :** *Equus caballus Papillomavirus* (Papilomavírus Equino)
- EGFR:** *Epidermal Growth Factor Receptor* (Receptor do Fator de Crescimento Epidermal)
- FdPV:** *Felis domesticus Papillomavirus* (Papilomavírus Felino)
- GNMT:** Glicina N-Metiltransferase
- HC:** *Hybrid Capture* (Captura Híbrida)
- HIV:** *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)
- HLA:** *Human Leucocitary Antigen* (Antígeno Leucocitário Humano)
- HSIL:** *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau)
- HSV:** *Herpes Simplex Virus* (Herpes Vírus)
- IC:** Intervalo de Confiança
- IHQ:** Imuno-histoquímica
- IL:** Interleucina
- INCA:** Instituto Nacional do Câncer
- LSIL:** *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau)
- MHC:** *Major Histocompatibility Complex* (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
- MS:** Metionina Sintase
- NIC I:** Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau I
- NIC II:** Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau II
- NIC III:** Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau III
- NIC:** Neoplasia Intraepitelial Cervical
- OR:** *Odds Ratio* (Razão de chance)
- OvPV:** *Ovine Papillomavirus* (Papilomavírus Ovino)
- pb:** pares de bases
- PCR:** *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
- PePV:** *Psittacus erithacus Papillomavirus* (Papilomavírus de Papagaio)
- pRB:** Proteína do Retinoblastoma
- RFLP:** *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Digestão enzimática)
- ROPV:** *Rabbit Oral Papillomavirus* (Papilomavírus Oral de Coelho)
- qsp:** quantidade suficiente para

**rpm:** rotações por minuto

**SAdoHci:** S-Adenosilhomocisteína

**SAdoMet:** S-Adenosilmetionina

**SHMT:** Serina Hidroximetiltransferase

**SNP:** *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de Base Única)

**SPF:** *Short PCR Fragment* (Pequeno Fragmento de PCR)

**THF:** Tetrahydrofolato

**TMP:** Timidinamonofosfato

**TNF:** *Tumor Necrosis Factor* (Fator de necrose tumoral)

**TS:** Timidilato Sintase

**VPN:** Valor Preditivo Negativo

**VPP:** Valor Preditivo Positivo

## SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO .....	12
2) OBJETIVOS .....	14
2.1) GERAL .....	14
2.2) ESPECÍFICOS .....	14
3) REVISÃO DA LITERATURA .....	15
3.1) HPV E CÂNCER CERVICAL .....	15
3.2) POLIMORFISMO C677T NO GENE DA ENZIMA MTHFR E CÂNCER CERVICAL ....	22
3.3) PESQUISA DE HPV E DIAGNÓSTICO DAS LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS .....	24
4) METODOLOGIA .....	28
4.1) OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS .....	29
4.2) PREPARAÇÃO E EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS .....	29
4.3) PESQUISA DE HPV .....	30
4.4) POLIMORFISMO C677T DO GENE DA ENZIMA MTHFR.....	32
4.5) ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34
5) RESULTADOS .....	35
5.1) INFECÇÃO POR HPV .....	35
5.2) POLIMORFISMO C677T DA MTHFR.....	37
6) DISCUSSÃO .....	41
6.1) METODOLOGIAS PARA PESQUISA DE HPV E GENOTIPAGEM DA MTHFR .....	41
6.2) FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO C677T NO GENE DA MTHFR .....	43
6.3) POLIMORFISMO C677T NO GENE DA ENZIMA MTHFR E O DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER CERVICAL .....	44
6.4) LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....	46
7) CONCLUSÃO .....	48
8) REFERÊNCIAS .....	49
9) ANEXOS .....	59

## 1) INTRODUÇÃO

O câncer cervical ou do colo do útero é o quarto tipo de neoplasia mais comum na população feminina mundial, com 529 mil novos casos e 275 mil mortes a cada ano (JEMAL *et al.*, 2011; IARC, 2012). A maioria dos casos ocorre em países subdesenvolvidos, onde o câncer no colo uterino é o mais comum entre as mulheres. Por outro lado, menores taxas de incidência deste tipo de tumor ocorrem em países desenvolvidos, em que os programas de prevenção, rastreamento e tratamento estão bem estabelecidos (IARC, 2012). No Brasil, o câncer cervical é o terceiro tipo de tumor que mais frequentemente acomete a população feminina, fazendo anualmente mais de 5.000 vítimas fatais (INCA, 2013; 2014).

A infecção persistente pelo Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco oncogênico é a principal causa da neoplasia cervical, sendo que 99,7% destes tumores estão associadas ao vírus (ZUR HAUSEN, 2002).

Entretanto, apenas 10% das mulheres que adquirem a infecção pelo HPV desenvolvem lesões pré-neoplásicas e menos que 1% destas alterações progridem levando ao tumor cervical (SASAGAWA, TAKAGI, MAKINODA, 2012; SCHIFFMAN, WENTZENSEN, 2013).

Desta forma, está bem estabelecido que, além da infecção por HPV, é necessária a presença de outros fatores para o desenvolvimento do câncer cervical. Atualmente, são conhecidos e estudados vários cofatores genéticos, epigenéticos e ambientais (CASTELLSAGUÉ, MUÑOZ, 2003; SZALMÁS, KÓNYA, 2009; FANG, ZHANG, JIN, 2014).

Em relação aos fatores genéticos, destaca-se o polimorfismo C677T no gene da enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR), uma flavoproteína que atua no metabolismo do folato, importante na replicação celular e na expressão gênica (DONALDSON, KERESZTESY, 1962; FOX, STOVER, 2008). Este polimorfismo foi identificado por Frosst e colaboradores em 1995 e consiste na troca de citosina (C) por timina (T) no códon 222, resultando na redução da atividade enzimática da MTHFR.

Dentre as variantes genéticas da enzima MTHFR, o polimorfismo C677T é o mais comumente encontrado na população, sendo que a frequência do genótipo polimórfico TT pode variar de acordo com a etnia (FROSST *et al.*, 1995; TRIMMER, 2013). Na população norte-americana, a frequência do alelo polimórfico é de aproximadamente 35%, enquanto as populações asiática e caucasiana apresentam taxas de 12% a 15% de indivíduos TT e maiores que 50% para CT. Por outro lado, a incidência do genótipo polimórfico é baixa entre americanos afrodescendentes (KIM, 2009).

O polimorfismo C677T no gene da MTHFR vem sendo associado a várias patologias, como doenças cardiovasculares, má formação do tubo neural, distúrbios psiquiátricos e câncer

(TRIMMER, 2013). Em relação às neoplasias, a presença do alelo polimórfico é considerada um fator de proteção para o câncer colorretal, leucemia linfóide aguda em adultos, algumas leucemias em crianças e linfomas. Todavia, o polimorfismo C677T vem sendo apontado como um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama, endométrio, esôfago, estômago, pâncreas e bexiga (UELAND *et al.*, 2001; KIM, 2005). Em relação ao câncer cervical, vários estudos vêm sendo realizados na tentativa de elucidar sua associação com o polimorfismo da MTHFR, mas os resultados ainda são controversos e inconclusivos (LONG *et al.*, 2012; MEI *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2013).



## 2) OBJETIVOS

### 2.1) GERAL

- Avaliar o polimorfismo C677T no gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) correlacionando-o à infecção por HPV e à gravidade das lesões cervicais pré-neoplásicas e neoplásicas.

### 2.2) ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência do polimorfismo C677T no gene da MTHFR e sua associação com a infecção pelo HPV e o câncer cervical em amostras de mulheres brasileiras e comparar os dados obtidos com outras regiões do país e também com outras etnias;
- Analisar a distribuição dos genótipos do polimorfismo C677T da MTHFR no grupo controle (ausência de lesão pré-neoplásica) e nos casos (lesões intraepiteliais de baixo grau, de alto grau e carcinoma epidermoide invasor);
- Comparar a análise do genótipo da MTHFR em amostras histológicas parafinadas utilizando diferentes metodologias: eletroforese em gel de agarose, em gel de poliacrilamida e eletroforese capilar;
- Avaliar a infecção por HPV em amostras histológicas parafinadas por duas metodologias: reação em cadeia da polimerase (PCR) e imuno-histoquímica (IHQ), comparando os resultados.

### 3) REVISÃO DA LITERATURA

O câncer cervical, cuja principal causa é a infecção persistente pelo HPV de alto risco oncogênico, é o quarto tipo de neoplasia mais frequente na população feminina mundial e o terceiro entre as mulheres de todo o Brasil e no estado de Minas Gerais (IARC, 2012; INCA, 2013).

A frequência média global da infecção pelo HPV em mulheres com citologia normal é de 11% a 12%, sendo que as maiores taxas são observadas na África Subsaariana (24%), leste europeu (21%) e América Latina (16%) (BOSCH *et al.*, 2013). No Brasil, a prevalência da infecção viral varia de 10,4% a 20,5% de acordo com a região. No sudeste do país, a frequência (10,4% a 17%) está próxima àquela encontrada em média na América Latina (AYRES, SILVA, 2010).

Maiores taxas de prevalência da infecção pelo HPV foram observadas em mulheres com idade inferior a 25 anos, diminuindo com o aumento da faixa etária em algumas populações. No entanto, em alguns casos, verificou-se um pico secundário da infecção viral, antecedendo a menopausa e no início desta fase. Por outro lado, alguns estudos mostraram que a prevalência do HPV entre as mulheres independe da faixa etária (BOSCH *et al.*, 2013).

#### 3.1) HPV E CÂNCER CERVICAL

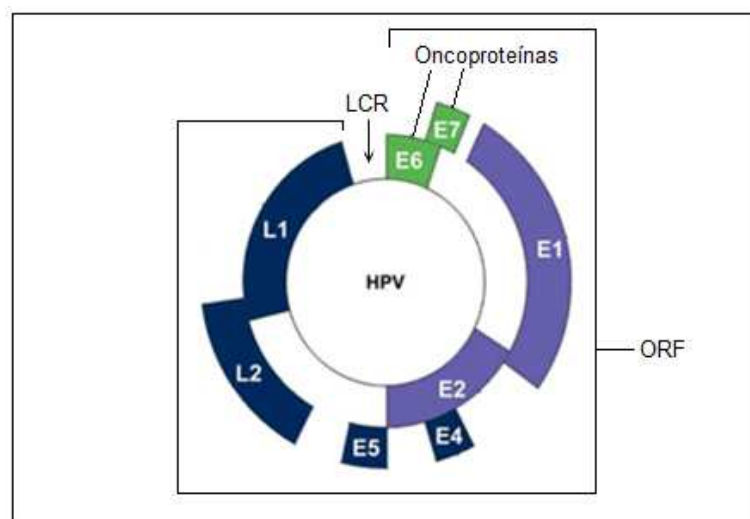
O HPV é um vírus pertencente à família Papillomaviridae juntamente com outros papilomavírus (PV) que infectam o epitélio de bovinos (BPV), equinos (EcPV), coelhos (ROPV), cães (COPV), felinos (FdPV), ovinos (OvPV), papagaios (PePV), dentre outros. Mais de 200 tipos de PVs com sequência do DNA distinta já foram descritos e agrupados em dezesseis gêneros, sendo que os HPVs pertencem aos gêneros Alpha-papilomavírus, Beta-papilomavírus, Gamma-papilomavírus, Mu-papilomavírus e Nu-papilomavírus. Este agrupamento filogenético em alguns casos reflete semelhanças biológicas entre os PVs. Entretanto, isto não ocorre na maioria das vezes e vários tipos e espécies de um mesmo gênero podem apresentar características completamente diferentes e ainda assim pertencerem a um mesmo gênero (DE VILLIERS *et al.*, 2004; BERNARD *et al.*, 2010).

Os HPVs podem ser cutâneos ou mucosos. Os cutâneos são epidermotrópicos, infectam principalmente a pele de mãos/pés e formam verrugas. O HPV mucoso infecta o revestimento da boca, garganta, trato respiratório ou epitélio anogenital e manifesta-se através de condilomas planos e acuminados (MÜNGER, HOWLEY, 2002; BURD, 2003; LETO *et al.*, 2011).

Já foram identificados mais de 160 tipos de HPV, sendo que sabidamente 40 deles infectam a região anogenital (DE VILLIERS *et al.*, 2004; FORSLUND, 2007; DE VILLIERS, GUNST, 2009; BERNARD *et al.*, 2010; BURK, HARARI, CHEN, 2013).

### 3.1.1) Estrutura do HPV

O HPV é um vírus não envelopado com aproximadamente 55nm de diâmetro (HUMANS, 1995; BURD, 2003). Seu genoma (Figura 1), uma molécula com DNA circular de fita dupla, com aproximadamente 8000pb, é dividido em uma região de controle (LCR) e oito faixas de leitura (ORF) – *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6*, *E7*, *L1* e *L2*. Os genes expressos no início da infecção, fase precoce, são denominados E (“*early*”) e aqueles expressos na fase mais tardia da infecção são denominados L (“*late*”) (ZUR HAUSEN, 2002).



**Figura 1:** Genoma do HPV. LCR: *Long Control Region* (Região de controle); ORF: *Open Reading Frame* (Faixa de leitura). Fonte: D'ABRAMO, ARCHAMBAULT, 2011 (modificada).

Os genes *E* codificam proteínas não estruturais que regulam a replicação e a transcrição do material genético viral, alterando o crescimento das células epiteliais infectadas e, para alguns genótipos de HPV, induzindo a instabilidade genética destas células (DOORBAR *et al.*, 2012).

As proteínas E1 e E2 são responsáveis pela replicação inicial nas células basais e pela síntese do DNA viral epissomal (FRAZER, 2004; DOORBAR *et al.*, 2012).

A função da proteína E4 está associada à amplificação do DNA viral e à modulação das alterações estruturais observadas nas células infectadas por HPV, os coilócitos. E4 também pode estar ligada à liberação de novas partículas virais e à infectividade das mesmas nas camadas superiores do epitélio cervical (STOLER, 2003; DOORBAR *et al.*, 2012)

E5 parece ser importante no curso inicial da infecção ao impedir a apoptose após danos ao DNA da célula hospedeira (DIMAIO, MATTOON, 2001). Além disso, ao interagir com o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), E5 colabora para a proliferação celular (PEDROZA-SAAVEDRA *et al.*, 2010). Também age na regulação da expressão das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classes I e II, inibindo-as em células infectadas (ZHANG *et al.*, 2003; MARCHETTI *et al.*, 2009). No entanto, quando lesões HPV positivas progredem para o câncer cervical, o DNA viral episossomal geralmente se integra ao material genético da célula hospedeira, levando à deleção de *E5*, o que significa que este gene não codifica uma proteína obrigatória em eventos tardios da carcinogênese mediada pelo HPV (FRAZER, 2004).

As oncoproteínas E6 e E7 possuem papel ainda incerto nas células da camada basal do epitélio. Entretanto, modulam o processo de transformação maligna do tecido infectado, sendo responsáveis pelo início da neoplasia cervical e pela sua progressão. Inibem a ação das proteínas do hospedeiro que regulam o crescimento celular e induzem a instabilidade genômica (MÜNGER E HOWLEY, 2002; MOODY, LAIMINS, 2010; DOORBAR *et al.*, 2012).

Por outro lado, os genes tardios (*L1* e *L2*) codificam proteínas estruturais que compõem o capsídeo viral. *L1* é a proteína principal, arranjada em pentâmeros, formando um capsídeo icosaédrico. Um número variável de moléculas de *L2*, menos que uma por pentâmero, está localizada na porção mais interna do capsídeo (FRAZER, 2004).

Entre os genes *L1* e *E6*, encontra-se uma região de controle denominada LCR (Figura 1), contendo de 500pb a 1000pb. Esta região está envolvida na expressão gênica e na replicação viral. Geralmente, a LCR não é muito conservada entre os tipos de HPV (LETO *et al.*, 2011).

### 3.1.2) Tipos virais

Alguns tipos de HPV foram classificados epidemiologicamente de acordo com o risco oncogênico (Tabela 1). Foram considerados HPVs de alto risco aqueles associados ao câncer cervical, e de provável alto risco os tipos virais encontrados com menor frequência em neoplasias no colo uterino. Já os tipos de baixo risco foram assim classificados por terem sido detectados em condilomas vulvo-genitais, lesões benignas. Os tipos 34, 57 e 83 foram considerados de risco indeterminado por não terem sido encontrados em nenhuma amostra cervical avaliada (MUÑOZ *et al.*, 2003; MUÑOZ *et al.*, 2006; BOUVARD *et al.*, 2009).

**TABELA 1:** Classificação dos tipos de HPV de acordo com o risco oncogênico

Risco oncogênico	Tipos de HPV
Alto risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
Provável alto risco	26, 53, 66, 68, 73, 82
Baixo risco	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, e CP6108

Fonte: MUÑOZ *et al.*, 2003; MUÑOZ *et al.*, 2006; BOUVARD *et al.*, 2009.

### 3.1.3) Desenvolvimento do câncer cervical

A transmissão do HPV normalmente ocorre através do contato direto pele-pele, pele-mucosa ou mucosa-mucosa, sendo necessária uma microabrasão no tecido para que este possa ser infectado pelo vírus. A forma mais comum de transmissão é através de relações sexuais, durante a penetração, embora o contato genital na ausência da mesma também possa levar à contaminação (GAVILLON *et al.*, 2010; MOSCICKI *et al.*, 2012). Além disso, a detecção do HPV em crianças e em mulheres virgens sugere a existência de transmissão não sexual que pode ocorrer por via vertical ou horizontal, ou por autoinoculação (SYRJÄNEN, PURANEN, 2000; CASON, MANT, 2005; CASTELLSAGUÉ *et al.*, 2009; SYRJÄNEN, 2010; FREITAS *et al.*, 2013).

O desenvolvimento da neoplasia cervical se dá basicamente através de quatro estágios: infecção por HPV de alto risco oncogênico, persistência da infecção viral, desenvolvimento de lesões pré-cancerosas e estabelecimento do câncer invasivo (FRAZER, LEGGATT, MATTAROLLO, 2011; SCHIFFMAN, WENTZENSEN, 2013).

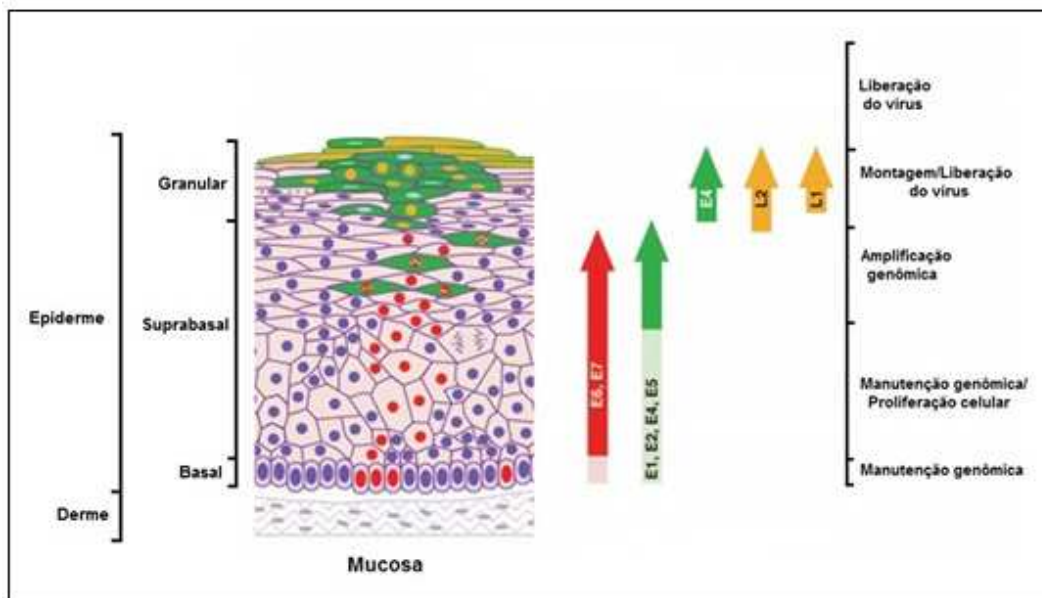
Embora todo o epitélio anogenital possa ser infectado pelo HPV, a zona de transformação do colo uterino, uma área composta por tecido metaplásico situada entre o epitélio escamoso vaginal e o tecido glandular do canal endocervical, é especialmente susceptível à carcinogênese (SCHIFFMAN, WENTZENSEN, 2013).

O HPV se reproduz no epitélio escamoso estratificado, utilizando a diferenciação do tecido para regular a sua replicação. Por isso, a infecção requer a disponibilidade de epiderme ou de células epiteliais da mucosa que ainda são capazes de proliferar, além da interação do vírus com proteoglicanas na superfície celular (GIROGLOU *et al.*, 2001). As células da camada basal infectadas pelo vírus se dividem e a infecção se propaga lateralmente (Figura 2). Algumas das células descendentes migram para a camada de células suprabasais, onde os genes virais são ativados. A expressão dos genes não estruturais do vírus (*E*) atrasa a diferenciação celular e promove a replicação das células infectadas, permitindo a amplificação do material genético do vírus. Após a expressão dos genes estruturais (*L*), já nas células epiteliais maduras, o genoma viral é

empacotado e virions maduros são então liberados, podendo infectar outras células (ZUR HAUSEN, 2002; FRAZER, LEGGATT, MATTAROLLO, 2011; DOORBAR *et al.*, 2012).

Para a maioria dos tipos de HPV, as infecções resultam em pouca ou nenhuma patologia local e ausência de resposta imunológica adaptativa mensurável, não se notando a soroconversão em mais de 40% das mulheres infectadas pelo vírus. A maior parte das infecções se resolve em 1 a 2 anos. Entretanto, ainda não se sabe como a resposta imune às proteínas virais leva à resolução da infecção e se esta corresponde à eliminação do DNA do vírus ou a um estado de latência com supressão da transcrição viral (INSINGA *et al.*, 2010; FRAZER, LEGGATT, MATTAROLLO, 2011).

Além da resposta imunológica, outros fatores modulam o curso da infecção viral: (a) o momento da infecção; (b) o tipo viral infectante, sendo que os de alto risco oncogênico tendem a uma infecção mais persistente; (c) a faixa etária – quanto maior, mais chance de persistência da infecção e (d) o estado nutricional (SCHLECHT *et al.*, 2003; SEDJO *et al.*, 2003; CASTLE *et al.*, 2005).



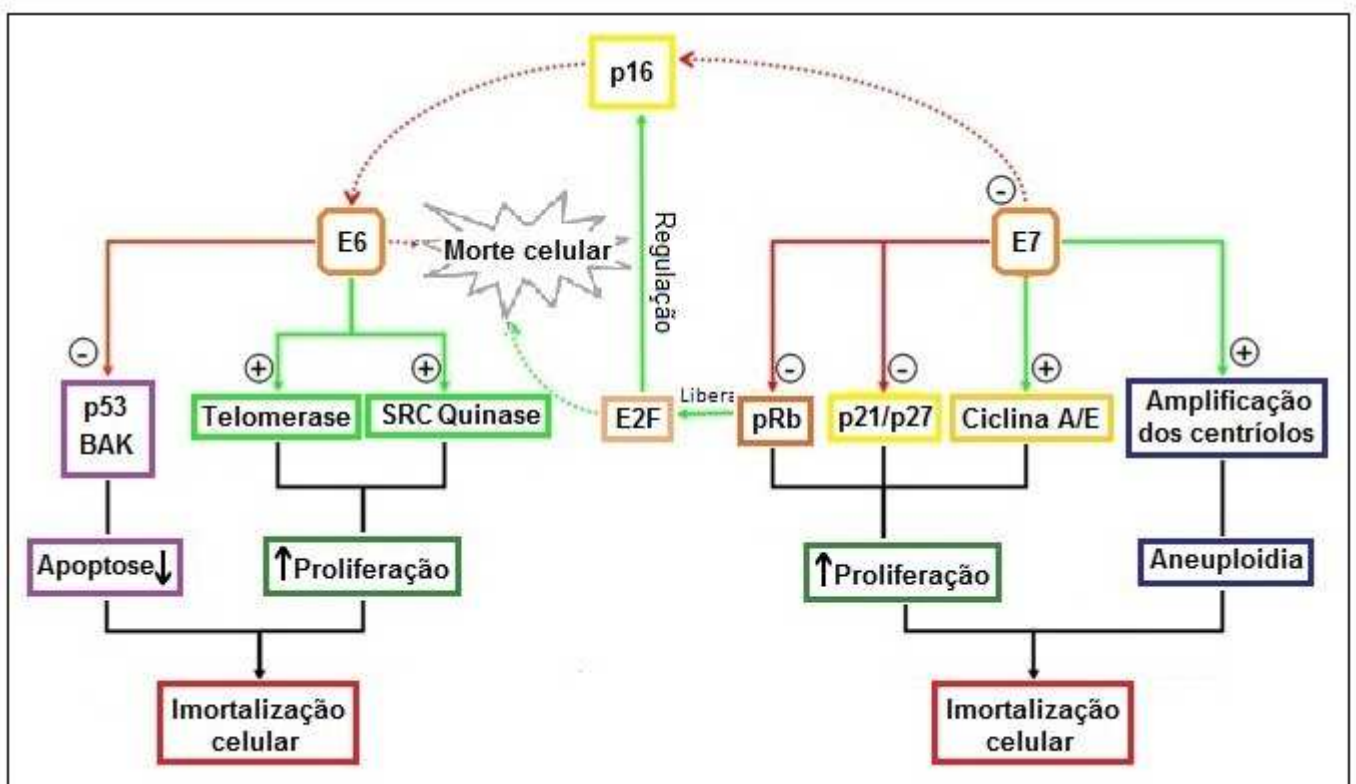
**Figura 2:** Mecanismo de infecção por HPV. Células da camada basal com o núcleo em vermelho representam aquelas primariamente infectadas pelo vírus, cuja progressão é representada acima de acordo com a expressão dos genes virais E (“Early”) e L (“Late”). Fonte: DOORBAR, 2006 (modificado).

A integração do genoma viral ao DNA do hospedeiro provavelmente é um dos passos decisivos para a oncogênese. Ela ocorre preferencialmente em regiões transcricionalmente ativas, próximo a locais do DNA que se encontram fragilizados, e é observada na maioria dos cânceres invasivos (PETER *et al.*, 2010). Também em algumas lesões de baixo grau e na maioria das lesões de alto grau, o genoma do HPV é integrado aos cromossomos (BURD, 2003; DE VILLIERS *et al.*, 2004). Entretanto, já foram encontradas células cervicais tumorais apenas com o DNA do HPV não integrado (epissomal) (DOORBAR *et al.*, 2012).

Quando o DNA viral se integra ao genoma do hospedeiro, os genes *E4/E5* e parte dos genes *E2* e *L2* são excluídos. Com a interrupção do gene *E2*, ocorre a super-expressão de *E6* e *E7*, devido à perda da repressão da transcrição destes genes mediada por *E2* (BERNARD, 2002; FRAZER, 2004; DOORBAR *et al.*, 2012).

A oncoproteína *E6* interage com *p53* e com a proteína pró-apoptótica *BAK*, levando à degradação de ambas, o que resulta em resistência à apoptose e aumento da instabilidade cromossômica (Figura 3). Além disso, *E6* promove a ativação da telomerase e da família das quinases *SRC*, estimulando a proliferação celular. A *p16* (*INK4A*), um inibidor de quinases ciclina-dependentes (*cdk*), pode neutralizar as ações da proteína *E6* (BOULET *et al.*, 2007).

Por outro lado, *E7* interage e degrada a proteína do retinoblastoma (*pRB*), liberando o fator de transcrição *E2F*, responsável pela expressão gênica na fase *S* do ciclo celular e pela regulação de *p16* (Figura 3). A atividade elevada de *E2F* pode levar à morte celular em células que expressam *E7* e à super-expressão de *p16*. Além disso, *E7* estimula a expressão dos genes das ciclinas *A/E* na fase *S* e parece bloquear a função de *p21* e *p27* (inibidores das *cdk*), levando a um aumento na proliferação. *E7* também induz a amplificação dos centríolos, o que acarreta aneuploidias nas células onde é expresso, contribuindo ainda mais para a tumorigênese (BOULET *et al.*, 2007; DUENSING *et al.*, 2007).



**Figura 3:** Ações das oncoproteínas *E6* e *E7* na imortalização celular. +: ativação. -: inibição. Fonte: BOULET *et al.*, 2007 (modificado).

Embora E6 e E7 possam imortalizar as células humanas de forma independente, isso ocorre com eficiência reduzida. Quando agem simultaneamente, há um aumento significativo na transformação da atividade celular, o que parece ser devido a um efeito complementar e sinérgico. E6 impede a morte celular induzida pelos altos níveis de E2F gerados pela ação E7, ao degradar as proteínas p53 e BAK. E7, por sua vez, inibe a atividade da p16, responsável pela inibição de E6 (Figura 3). Desta maneira, a ação combinada de E6 e E7 sobre os reguladores do ciclo celular, principalmente da fase S, mantém a célula apta a se replicar de maneira descontrolada. Assim, a infecção viral persistente leva à diminuição da apoptose, ao aumento da proliferação celular, à imortalização celular e, conseqüentemente, ao câncer (DUENSING E MÜNGER, 2004; BOULET *et al.*, 2007; MOODY, LAIMINS, 2010).

### 3.1.4) Cofatores genéticos e o câncer cervical

A progressão da infecção viral à neoplasia cervical depende não só da infecção persistente por HPV de alto risco, como também de outros fatores (NAKAGAWA, SCHIRMER, BARBIERI, 2010). Estes podem exercer um importante papel tanto na persistência da infecção pelo HPV quanto na transformação maligna do tecido cervical, estando ligados ao surgimento de lesões no colo uterino e à progressão ou não destas ao câncer (KJELLBERG *et al.*, 2000; DE SANJOSÉ *et al.*, 2007).

Como cofatores ambientais pode-se citar o tabagismo, exposição à fumaça proveniente da queima de madeira, uso prolongado de contraceptivos orais, multiparidade, início precoce da atividade sexual, múltiplos parceiros, outras infecções sexualmente transmissíveis (*Chlamydia trachomatis*, HIV, HSV) e fatores nutricionais, como baixos níveis de folato (CASTELLSAGUÉ, MUÑOZ, 2003).

Em relação aos cofatores intrínsecos ao hospedeiro, além da resposta imunológica e do estado hormonal, há evidências da associação de fatores genéticos com a carcinogênese cervical, uma vez que estudos demonstraram hereditariedade no desenvolvimento desta neoplasia (MAGNUSSON, LICHTENSTEIN, GYLLENSTEN, 2000; VINK *et al.*, 2011).

Os polimorfismos de base única (SNPs) são as variações genéticas que ocorrem com maior frequência, já tendo sido identificados 38 milhões, o que corresponde a 95% de todas as alterações observadas no genoma humano (ALTSHULER *et al.*, 2010; ABECASIS *et al.*, 2012). Por isso, os SNPs têm sido alvo de diversos estudos na associação com o desenvolvimento de neoplasias, inclusive com o câncer cervical (SAVAS E LIU, 2009; BAG, JYALA, BAG, 2012; SAVAS, LIU, XU, 2013).



Dentre os genes que codificam proteínas que atuam na regulação do ciclo celular, pode-se citar o *TP53*, gene supressor tumoral responsável por codificar a proteína p53. Sugere-se que a ausência do polimorfismo no códon 72 deste gene, que consiste na substituição de um resíduo de arginina por prolina, leva à maior susceptibilidade de degradação de p53 pela oncoproteína E6 do HPV (STOREY *et al.*, 1998). O polimorfismo no gene *Tp53* se associa de maneira controversa ao câncer cervical, variando de acordo com a etnia (LEE *et al.*, 2004; MITRA *et al.*, 2005). Resultados inconclusivos também foram encontrados na associação do polimorfismo no gene *WAF1/p21*, que codifica a proteína p21 (LEE *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2006), e a associação do polimorfismo nos genes que codificam Fas e seu ligante (LAI *et al.*, 2005; CHATTERJEE *et al.*, 2009). Sun e colaboradores (2007) constataram risco reduzido de desenvolvimento do câncer cervical na presença do polimorfismo do gene *CASP8*, responsável por codificar a caspase 8, proteína que atua na morte celular por apoptose.

Polimorfismos nos genes *ERCC2/XPD* e *XPC*, e no gene *APE1*, cujos produtos atuam no reparo do DNA por excisão de nucleotídeos e por excisão de bases, respectivamente, também foram associados ao câncer cervical (SHEKARI *et al.*, 2008a; GANGWAR *et al.*, 2010). O mesmo foi observado para genes que codificam citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF) (STANCZUK *et al.*, 2003) e a interleucina-10 (SZÖKE *et al.*, 2004), bem como para seus receptores (SINGH *et al.*, 2009), além de outros componentes do sistema imunológico, como o antígeno leucocitário humano (HLA) (TRIMBLE *et al.*, 2005) e os *tool like receptors* (TLRs) (PANDEY *et al.*, 2009).

SNPs nos genes que codificam enzimas que atuam no ciclo do folato também têm sido relacionados ao câncer cervical, principalmente o polimorfismo C677T no gene da MTHFR (KIM, 2009; TOMITA *et al.*, 2013).

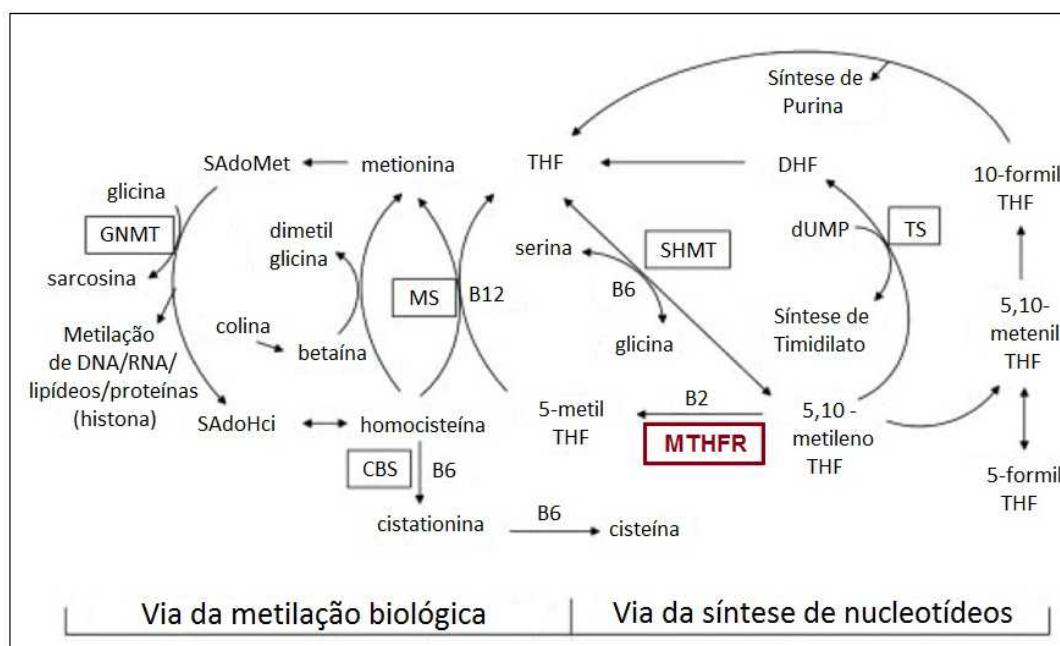
### 3.2) POLIMORFISMO C677T NO GENE DA ENZIMA MTHFR E CÂNCER CERVICAL

A enzima MTHFR foi primeiramente descrita em tecido hepático suíno em 1959 e caracterizada como um dímero de cerca de 70 KDa, com cada subunidade possuindo dois domínios globulares, formando 4 resíduos em uma roseta planar (DONALDSON, KERESZTESY, 1962; TRIMMER, 2013).

Possui um papel central na metilação, síntese e reparo do DNA, atuando no metabolismo do folato. É responsável pela homeostase intracelular deste micronutriente, uma vez que determina qual a proporção de folato será utilizada para síntese de nucleotídeos ou metilação do DNA (KANG *et al.*, 2005).

O substrato da MTHFR, 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-metilenoTHF), é utilizado na síntese de nucleotídeos (Figura 4), sendo essencial para a manutenção da integridade do material genético. Já o produto desta enzima, 5-metiltetrahidrofolato (5-metilTHF), é utilizado na metilação biológica, incluindo a metilação do DNA (Figura 4). A conversão de 5,10-metilenoTHF a 5-metilTHF é um processo irreversível (DONALDSON, KERESZTESY, 1962).

O gene da MTHFR, localizado no braço curto do cromossomo 1, na posição 1p36.3, apresenta vários SNPs, dentre eles os polimorfismos C677T, A1298C, T1059C, T1317C e G1793A (WEISBERG *et al.*, 1998; TREMBATH *et al.*, 1999; RADY *et al.*, 2002). O polimorfismo C677T no gene da MTHFR consiste na substituição de um resíduo de citosina (C) por timina (T), no exon 4, códon 222, nucleotídeo 677, e resulta na troca de alanina por valina, afetando o domínio catalítico da MTHFR. Tal polimorfismo leva à diminuição da atividade desta enzima: indivíduos homocigotos para o alelo T têm um decréscimo na atividade enzimática de 70% e aqueles heterocigotos (CT), de 40% (FROSST *et al.*, 1995).



**Figura 4:** Metabolismo do folato. MTHFR (vermelho): MetilenoTHF Redutase; CBS: Cistationina β-Sintase; DHF: Dihidrofolato; GNMT: Glicina N-Metiltransferase; MS: Metionina Sintase; SAdoHci: S-Adenosilhomocisteína; SAdoMet: S-Adenosilmetionina; SHMT: Serina Hidroximetiltransferase; THF: Tetrahidrofolato; TS: Timidilato Sintase. Fonte: CHOI; MASON, 2000 (modificada).

No entanto, uma dieta adequada pode elevar os níveis de folato, o que garante a conversão de 5,10-metilenoTHF a 5-metilTHF de forma satisfatória, alterando o efeito do polimorfismo C677T no gene da MTHFR. Indivíduos com o polimorfismo e que possuem altas concentrações séricas de folato e dos nutrientes envolvidos no seu metabolismo, tais como as vitaminas B12 e B2 (riboflavina), podem apresentar um menor risco de câncer, porque os altos níveis intracelulares de

5,10-metilenoTHF previnem o desequilíbrio no *pool* de nucleotídeos durante a síntese de DNA (BIRD, 2002).

Por outro lado, quando a ingestão de folato e de outros nutrientes envolvidos no seu metabolismo é baixa, indivíduos com o polimorfismo C677T apresentam menor produção de 5-metilTHF, o que acarreta alterações no padrão de metilação do DNA, que é um mecanismo epigenético que influencia a transcrição gênica, a estrutura da cromatina e a estabilidade genômica (BIRD, 2002). Tais alterações em regiões promotoras de genes supressores tumorais são características de vários tipos de câncer (SHARMA, KELLY, JONES, 2010). Todavia, quando os níveis de folato estão baixos, a disponibilidade de 5,10-metilenoTHF é preservada, o que reduz a probabilidade de comprometimento da síntese de DNA (MA *et al.*, 1997).

Apesar da importância da enzima MTHFR na replicação celular, expressão gênica e no desenvolvimento de tumores, o polimorfismo C677T no seu gene se associa de maneira controversa ao risco de desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da cérvix uterina (GUO, 2012; LONG *et al.*, 2012; LUO *et al.*, 2012; MEI *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2013).

### 3.3) PESQUISA DE HPV E DIAGNÓSTICO DAS LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS

O diagnóstico das lesões cervicais pré-neoplásicas e do câncer no colo uterino é realizado através da citologia, colposcopia e biópsia (histologia). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil preconiza-se que mulheres entre 25 e 64 anos de idade realizem o exame citopatológico anualmente. Após dois resultados negativos, o intervalo entre os exames passa a ser de 3 anos (INCA, 2011).

A análise citopatológica, também conhecida como exame preventivo ou Papanicolaou, foi proposta pelo médico George Papanicolaou em 1941 (PAPANICOLAOU E TRAUT, 1997). Esta técnica, considerada a mais eficaz para a prevenção do câncer cervical, consiste na avaliação morfológica das células epiteliais obtidas por esfoliação do colo uterino, a fim de se diagnosticar e classificar lesões precursoras do tumor (SELLORS E SANKARANARAYANAN, 2003). Atualmente, a nomenclatura utilizada nas análises citopatológicas segue a Classificação Citológica Brasileira (INCA, 2006), baseada no Sistema de Bethesda 2001 (SOLOMON *et al.*, 2002) (Tabela 2). Caso a mulher apresente Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL) ou Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL) persistente, esta deve ser encaminhada à colposcopia (INCA, 2011).

Este é um exame visual do colo uterino realizado com o colposcópio, um microscópio binocular de baixa resolução, que confere um aumento de dez a quarenta vezes do colo uterino, na

presença de uma fonte de iluminação potente. Através da colposcopia, torna-se possível identificar alterações que não são vistas a olho nu. Caso alguma lesão seja visualizada, parte do tecido pode ser retirada (biópsia) para posterior análise histopatológica (SELLORS, SANKARANARAYANAN, 2003).

**TABELA 2:** Sistema de classificação das lesões cervicais

<b>Classificação Citológica Brasileira</b>	<b>Classificação Histológica de Richart</b>
Alterações benignas	-
Atipias de significado indeterminado (ASC-US e ASC-H)	-
LSIL	NIC I
HSIL AIS	NIC II e NIC III
Carcinoma invasor	Carcinoma invasor

ASC-US: Células escamosas atípicas de significado indeterminado; ASC-H: Células Escamosas Atípicas em que não se pode excluir Lesão de Alto Grau; LSIL: Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau; HSIL: Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau; AIS: Adenocarcinoma *in situ*; NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical. Fonte: INCA, 2011 (modificado).

Na histopatologia, as lesões pré-neoplásicas ou o carcinoma invasor são diagnosticados de acordo com a diferenciação, maturação e estratificação das células e alterações nucleares, sendo o tecido epitelial totalmente avaliado (SELLORS, SANKARANARAYANAN, 2003). Nesta análise, utiliza-se a Classificação Histopatológica de Richart para denominação das lesões cervicais (RICHART, 1967) (Tabela 2). Associada à colposcopia, a análise histopatológica é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico do câncer cervical (SINGER, MONAGHAN, 2000).

### 3.3.1) Pesquisa de HPV

A detecção do HPV, principal fator de risco para a carcinogênese cervical, é importante tanto para complementar o diagnóstico das lesões pré-neoplásicas quanto no acompanhamento de mulheres após o tratamento. Além disso, a pesquisa do vírus é útil no rastreamento primário de mulheres com idade superior a 30 anos (BOSCH *et al.*, 2013; HUH *et al.*, 2015).

As técnicas de biologia molecular tornaram possível a pesquisa do DNA do HPV nas amostras cervicais, sendo a captura híbrida de segunda geração (HC2) e a reação em cadeia de polimerase (PCR), as técnicas mais utilizadas (IFTNER, VILLA, 2003; POLJAK *et al.*, 2012; GIBSON, 2014).

A HC2 possui alta sensibilidade e permite a detecção de 18 tipos diferentes de HPV (LÖRINCZ, 1996). Esta técnica se baseia na hibridação de sondas complementares de RNA a

seqüências do DNA viral, sendo possível diferenciar a infecção por HPV de alto risco oncogênico de infecções por tipos virais de baixo risco, fornecendo uma medida semi-quantitativa da carga viral. Entretanto, há a possibilidade de reações cruzadas acontecerem, o que diminui a especificidade da HC2 (PEYTON *et al.*, 1998).

A técnica de PCR consiste na amplificação *in vitro* no DNA do HPV, utilizando-se conjuntos de iniciadores genéricos, que amplificam regiões altamente conservadas do gene L1 do HPV, permitindo a amplificação de basicamente todos os tipos virais (DE RODA HUSMAN *et al.*, 1995; KLETER *et al.*, 1998; GRAVITT *et al.*, 2000). Os pares de iniciadores genéricos mais utilizados são: a) MY09/11 e sua versão modificada PGMY09/11 (GRAVITT *et al.*, 2000) e b) GP5/GP6 e sua versão estendida GP5+/GP6+ (DE RODA HUSMAN *et al.*, 1995). Além disso, há outros iniciadores capazes de amplificar um fragmento menor, cujo método é denominado de SPF-PCR (pequeno fragmento de PCR) (KLETER *et al.*, 1998). Quando associada a outras técnicas, como digestão enzimática (RFLP) ou sequenciamento do DNA, a PCR também permite a genotipagem do vírus.

Foram identificados 125 testes disponíveis no mercado para pesquisa de HPV, além de 84 variações destas técnicas, com sensibilidade e especificidade diferentes. No entanto, até o momento, nenhum método foi escolhido para utilização na rotina laboratorial a fim de complementar o diagnóstico e prognóstico de lesões pré-neoplásicas no colo uterino (POLJAK *et al.*, 2012).

O HPV também pode ser detectado por imuno-histoquímica (IHQ), utilizando anticorpos específicos para a proteína L1 do vírus. Esta metodologia permite não só a detecção viral, como também a diferenciação do momento da infecção (RAUBER *et al.*, 2008). Maior expressão de L1/HPV é detectada na fase produtiva da infecção, enquanto o DNA viral encontra-se episomal (WRIGHT *et al.*, 2004). Havendo a progressão da infecção, inicia-se a fase de transformação, em que o DNA do HPV se integra ao material genético do hospedeiro, diminuindo a expressão de L1 (MCMURRAY *et al.*, 2001). Entretanto, menor expressão da proteína do capsídeo viral também pode ocorrer em infecções latentes (UNGUREANU *et al.*, 2010).

Apesar da detecção do HPV complementar o diagnóstico das lesões intraepiteliais cervicais, esta medida por si só não é suficiente para o rastreamento primário desta neoplasia e para determinar o curso das lesões pré-cancerosas, uma vez que a maioria das mulheres possuindo HPV apresenta a regressão da infecção (HOSTE, VOSSAERT, POPPE, 2013).

Além disso, embora a conduta para triagem e diagnóstico do câncer cervical seja bem estabelecida e eficaz na diminuição da sua incidência, todos os procedimentos utilizados (citologia, colposcopia e histopatologia) são subjetivos, podendo variar de acordo com o profissional que os realiza, sendo considerável o número de mulheres encaminhadas para biópsia cervical e tratadas desnecessariamente (CROTHERS *et al.*, 2014; STOLER *et al.*, 2015).

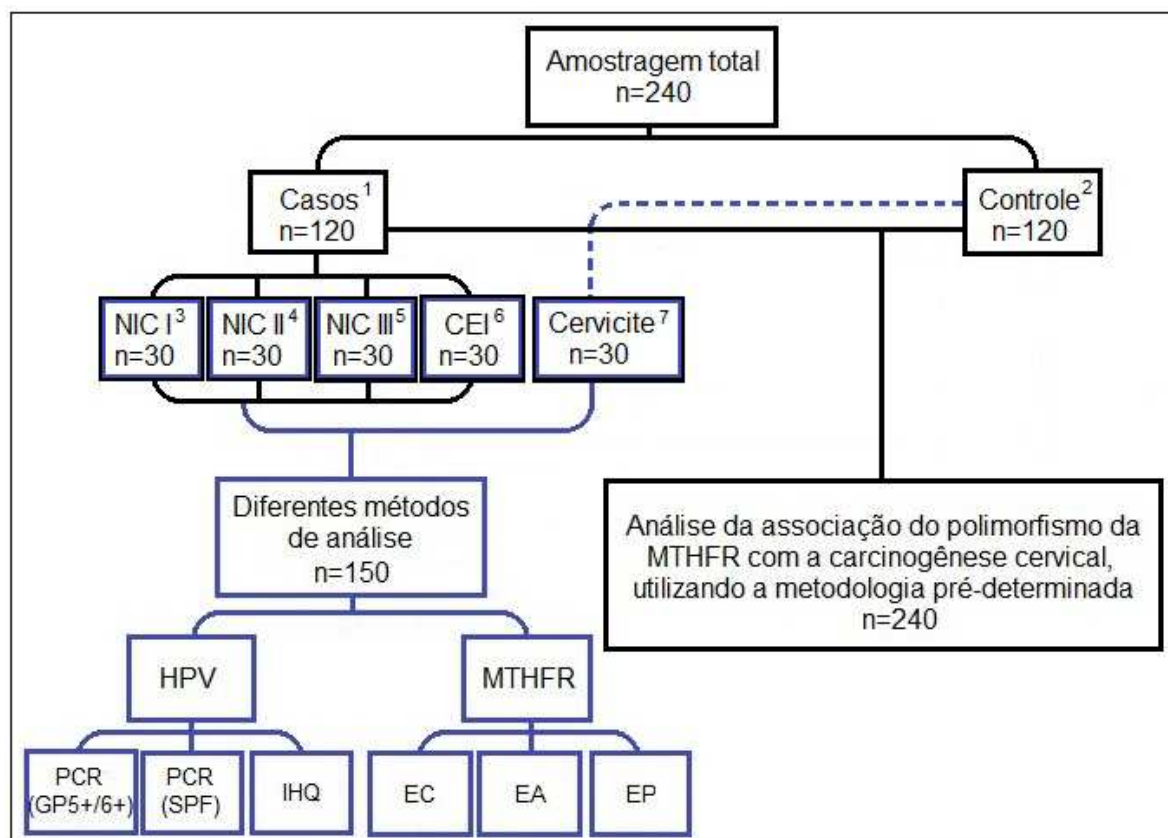
Neste sentido, muitos cofatores estão associados à carcinogênese cervical, modulando a progressão da infecção à neoplasia. Desta forma, torna-se importante a identificação de fatores e de marcadores para o estabelecimento de um prognóstico preciso, capaz de determinar a melhor forma de acompanhamento e tratamento de mulheres possuindo a infecção viral e/ou lesão pré-neoplásica.

#### 4) METODOLOGIA

Neste trabalho foram utilizadas 240 amostras cervicais para análise do polimorfismo C677T da MTHFR e de sua associação com a infecção por HPV e com gravidade das lesões cervicais (Figura 5). O grupo de casos foi composto 120 amostras histológicas divididas em quatro grupos de 30: Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) de graus I, II e III, e Carcinoma Epidermoide Invasor (CEI). Foram consideradas do grupo controle (sem lesão cervical) o mesmo número de amostras (n=120), sendo 30 histológicas (biópsias cervicais apresentando cervicite) e 90 citológicas (exames preventivos sem atipia celular).

A faixa etária das mulheres que constituíram a amostragem variou de 15 a 82 anos, sendo a média e o desvio padrão de  $39,8 \pm 13,8$  anos.

A comparação dos diferentes métodos de análise utilizados para a pesquisa do HPV e para genotipagem da MTHFR foi realizada com as 150 amostras histológicas: 30 de cada grupo de casos (120) e 30 do grupo controle (Figura 5).



**Figura 5:** Desenho do estudo. <sup>1</sup>Amostras cervicais histológicas apresentando lesões; <sup>2</sup>Amostras cervicais sem lesão; <sup>3</sup>Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau I; <sup>4</sup>Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau II; <sup>5</sup>Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau III; <sup>6</sup>Carcinoma epidermoide invasor; <sup>7</sup>Amostras cervicais histológicas apresentando cervicite; PCR: Reação em Cadeia da Polimerase; IHQ: Imuno-Histoquímica; EC: Eletroforese Capilar; EA: Eletroforese em Gel de Agarose; EP: Eletroforese em Gel de Poliácridamida.

#### 4.1) OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras histológicas (n=150) foram coletadas de mulheres residentes em todo o estado de Minas Gerais no período de 2006 a 2011 e analisadas no Laboratório Tafuri (LT), que disponibilizou os blocos de biópsia utilizados neste trabalho. Os laudos anatomopatológicos foram emitidos pelo LT de acordo com a Classificação Histológica de Richart (RICHART, 1967).

As amostras citológicas (n=90, controle) foram coletadas em 2009 de mulheres residentes em Ouro Preto, MG, participantes do projeto “Prevalência do Papilomavírus Humano e estudo dos cofatores envolvidos na carcinogênese relacionada ao vírus na população de Ouro Preto, MG”. Estas amostras foram analisadas e tiveram laudo citopatológico emitido pelo Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC) da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto. A avaliação do material foi realizada com base na Classificação Citológica Brasileira (INCA, 2006).

As mulheres residentes em Ouro Preto e Itabirito (MG) foram contatadas e, após esclarecimento sobre o trabalho, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1A) permitindo que seu material fosse analisado. As amostras histológicas provenientes de mulheres de outras cidades bem como aquelas de pacientes não encontradas, foram avaliadas com o consentimento do LT (Anexo 1B), devido à impossibilidade de contatar as mulheres.

O processo de seleção das amostras e os procedimentos utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), CAAE: 0022.0.238.000-10 (Anexo 2).

#### 4.2) PREPARAÇÃO E EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS

Para extração de DNA de cada bloco de biópsia foram utilizados 3 cortes histológicos de 10µm de espessura. Estes foram acondicionados em microtubos de 1,5ml e mantidos à temperatura ambiente até o momento da extração. Os cortes foram obtidos no micrótomo MRP09<sup>®</sup> (Lupetec), usando navalhas descartáveis.

Para desparafinização das amostras, adicionou-se 1,5ml de xilol aos cortes histológicos. Após centrifugação a 9000rpm durante 3 minutos, o xilol foi descartado. Em seguida, foi adicionado 1,0ml de etanol absoluto e as amostras foram novamente centrifugadas a 9000rpm durante 3 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Para evaporação do etanol residual, as amostras foram incubadas a 37°C nos microtubos com as tampas abertas.

A extração de DNA foi realizada utilizando o *Kit* QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE Tissue (QIAGEN). Inicialmente, foram adicionados 20µl de proteinase K e 180µl de tampão de lise às amostras



desparafinizadas. Após incubação a 56°C durante a noite, seguida de outra a 90°C por 60 minutos, a extração do DNA das amostras foi realizada de acordo com o protocolo descrito detalhadamente no Anexo 3. O DNA extraído foi armazenado a -80°C até o seu processamento.

As amostras citológicas (n=90, controle) foram coletadas por enfermeiros ou médicos das equipes de saúde de Ouro Preto nos Postos de Saúde do município. Para a coleta foram utilizadas espátulas de Ayre para amostra ectocervical e escovas (Cytobrush®) para amostra endocervical. Após confecção do esfregaço em uma lâmina de vidro, devidamente identificada, as escovas utilizadas para coleta do material endocervical foram armazenadas em microtubos contendo 1,0ml de Tampão de Coleta®, fabricado e cedido pelo Centro de Genomas, São Paulo (SP), e armazenadas a -20°C até a extração de DNA. Esta, por sua vez, foi realizada com o *Kit* illustra blood genomicPrep Mini Spin® (GE Healthcare), conforme recomendações do fabricante (Anexo 4).

A concentração e a pureza do DNA extraído foram determinadas por densidade óptica no espectrofotômetro Cirrus 80MB® (Femto).

#### 4.3) PESQUISA DE HPV

##### 4.3.1) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A detecção do HPV nas amostras histológicas foi realizada utilizando a técnica PCR com os iniciadores GP5+/GP6+ (DE RODA HUSMAN *et al.*, 1995) e SPF (KLETER *et al.*, 1998). Os iniciadores MY09/MY11 (GRAVITT *et al.*, 2000) foram utilizados para pesquisa do vírus nas amostras citológicas.

A sequência dos iniciadores e o protocolo da PCR estão apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5.

**TABELA 3:** Sequência dos iniciadores utilizados para detecção do HPV

Iniciadores	Sequência de nucleotídeos
GP5+	TTTGTACTGTGGTAGATACTAC
GP6+	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC
SPF 1A	GCiCAGGGiCACAATAATGG
SPF 1B	GCiCAGGGiCATAACAATGG
SPF 1C	GCiCAGGGiCATAATAATGG
SPF 1D	GCiCAAGGiCATAATAATGG
SPF 2B	GTiGTATCiACAACAGTAACAAA
SPF 2D	GTiGTATCiACTACAGTAACAAA
MY09	CGTCCCAGGGGATACTGATC
MY11	GCCCAGGGTCATAATAATGG

**TABELA 4:** Quantidade de reagentes utilizados no protocolo de PCR para pesquisa de HPV

Reagentes	Iniciadores		
	GP5+/GP6+	SPF	MY09/MY11
PCR Master Mix <sup>®1</sup>	6,25µl	12,5µl	12,5µl
Iniciadores (10pmol/µl)	0,5µl	0,5µl	1,0µl
DNA	90ng	25ng	200ng
Água <sup>2</sup>	qsp 12,5µl	qsp 25µl	qsp 25µl

<sup>1</sup>0,2mM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> e 1,0 unidade de Taq DNA (Promega); <sup>2</sup>*Nuclease Free-water* (Promega)

**TABELA 5:** Protocolo de PCR para pesquisa de HPV no Termociclador NyxTechnik

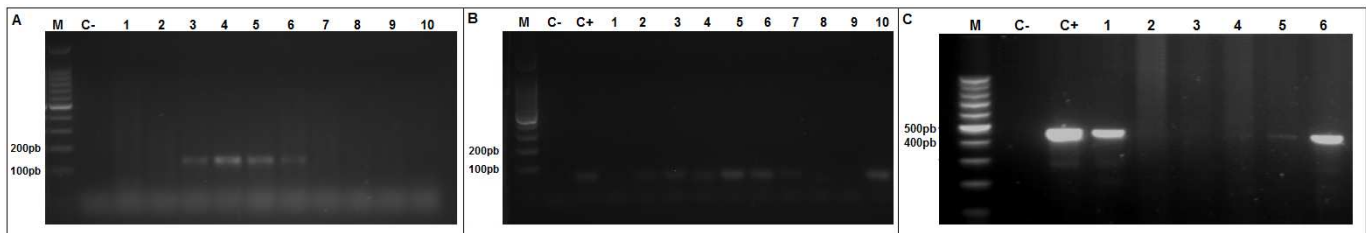
Iniciadores	Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Reação
GP5+/GP6+	1	95	5	Desnaturação
	40	95	1	Desnaturação
		45	2	Anelamento
		72	1,5	Extensão
		72	10	Extensão final
SPF	1	94	1	Desnaturação
	40	94	1	Desnaturação
		45	1	Anelamento
		72	1	Extensão
		72	5	Extensão final
MY09/MY11	1	95	4	Desnaturação
	40	94	1	Desnaturação
		51,5	1	Anelamento
		72	1	Extensão
		72	7	Extensão final

Os produtos de amplificação das reações foram identificados utilizando eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed<sup>®</sup> (Biotium). Para aplicação em gel, foram utilizados 5,0µl do produto amplificado e 1,0µl de *Loading Dye Buffer 6X*<sup>®</sup> (Fermentas, 0,25% de azul de bromofenol, 15% de Ficol tipo 400).

A presença do HPV foi confirmada naquelas amostras onde houve amplificação de fragmentos de 160pb para os iniciadores GP5+/GP6+ (Figura 6A), 65pb para SPF (Figura 6B) e 450pb para MY09/MY11 (Figura 6C).

#### 4.3.2) Análise imuno-histoquímica da proteína L1/HPV

A expressão da proteína L1/HPV foi avaliada por Pitol (2012) nas 150 amostras histológicas pela técnica de imuno-histoquímica (IHQ), utilizando anticorpos monoclonais anti-L1/HPV (Dako, M3528) e o sistema EnVision Dakocytomation (EnVision<sup>®</sup> + system-HRP AEC, K4004, Dako).



**Figura 6:** Géis de agarose representativos das amostras amplificadas por PCR utilizando os iniciadores **A)** GP5+/GP6+: 3, 4, 5 e 6 - amostras HPV positivas (160pb); 1, 2, 7, 8, 9 e 10 - amostras HPV negativas. **B)** SPF: 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 10 - amostras HPV positivas (65pb); 1, 8 e 9 - amostras HPV negativas. **C)** MY09/MY11: 1, 4, 5, 6 - amostras HPV positivas (450pb); 2 e 3 - amostras HPV negativas. M, marcador de peso molecular de 100pb; C-, controle negativo; C+, controle positivo.

Foram documentadas para análise, especificamente, células da junção escamo-colunar (JEC) ou zona de transformação cervical. As lâminas foram observadas em microscopia convencional em campo claro, objetiva de 40x e a imagem foi capturada por uma microcâmera digital Leica DFC340FX acoplada ao microscópio DM5000B.

A documentação foi realizada em 10 campos por lâmina, selecionados ao acaso. Somente a coloração nuclear foi considerada como marcação positiva, independente da intensidade de coloração. A contagem dos núcleos positivos e negativos nos campos fotografados foi efetuada utilizando o *software* ImageJ, disponível gratuitamente na Internet (macbiophotonics.ca). A contagem possibilitou a determinação da porcentagem de núcleos positivos em relação ao número total de células quantificadas. A presença do HPV foi considerada naquelas amostras em que houve marcação maior ou igual a 25%.

Neste trabalho, os resultados da análise IHQ foram comparados aos dados da pesquisa de HPV por PCR nas mesmas amostras histológicas.

#### 4.4) POLIMORFISMO C677T DO GENE DA ENZIMA MTHFR

O polimorfismo da MTHFR foi analisado através da técnica de PCR seguida por digestão enzimática (RFLP). A integridade do DNA extraído foi avaliada com o próprio gene da MTHFR, uma vez que este é constitutivo.

Os iniciadores utilizados (*Forward*: AGGACGGTGCGGTGAGAGTG; *Reverse*: TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGA) foram descritos em 1995 por Frosst e colaboradores.

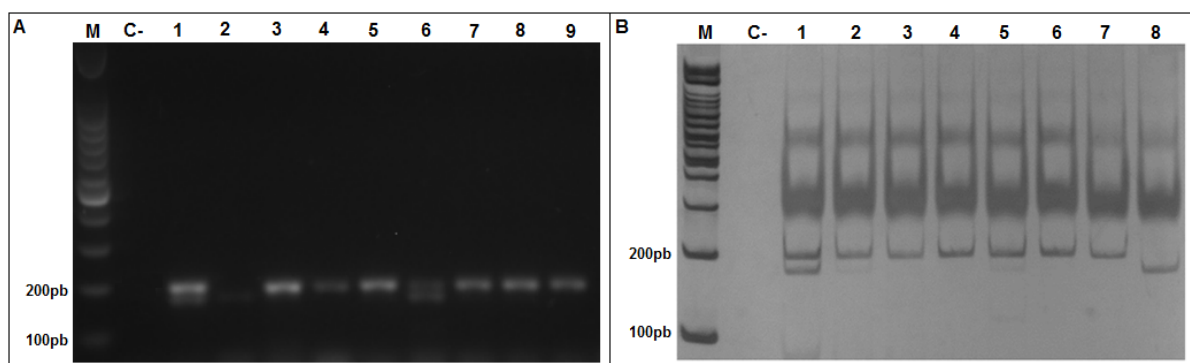
Nas reações de PCR, foram utilizados 12,5µl de PCR Master Mix<sup>®</sup> (Promega), 9,5µl de água (“*Nuclease Free-water*”), 1µl de cada iniciador (10pmol/µl) e 1µl da solução com o DNA (30ng/µl) extraído a partir de amostra histológica. O protocolo de reação foi padronizado: 95°C durante 4 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 1 minuto, 59°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, extensão final a 72°C durante 5 minutos.

Os diferentes genótipos do gene da MTHFR foram identificados por RFLP, utilizando a endonuclease de restrição *FastDigest Hinf I*<sup>®</sup> (Thermo Scientific). O volume final da reação foi de 20µL (1µL da enzima 1U/µL, 2µL de tampão, 17µL de água (“*Nuclease Free-Water*”) e 10µL do DNA amplificado). A reação foi incubada a 37°C durante 5 minutos, seguidos de 20 minutos a 65°C para inativação da enzima.

Os fragmentos gerados pela restrição enzimática foram analisados por três diferentes técnicas: eletroforese em gel de agarose 2% (EA) corado com GelRed<sup>®</sup> (Biotium), em gel de poliacrilamida 6% (EP) corado com nitrato de prata e eletroforese capilar (EC).

A técnica de análise por EA (Figura 7A) foi realizada conforme descrito no item 4.3.1.

Para EP (Figura 7B), foram aplicados 2,5µL do produto digerido e 2,5µL de *Loading Dye Buffer 6X*<sup>®</sup> (Fermentas). Após eletroforese, os géis foram imersos em solução fixadora por 15 minutos e incubados com solução de nitrato de prata (3g/L) por 10 minutos. Posteriormente, foram imersos em solução reveladora até a visualização dos fragmentos (Anexo 5).

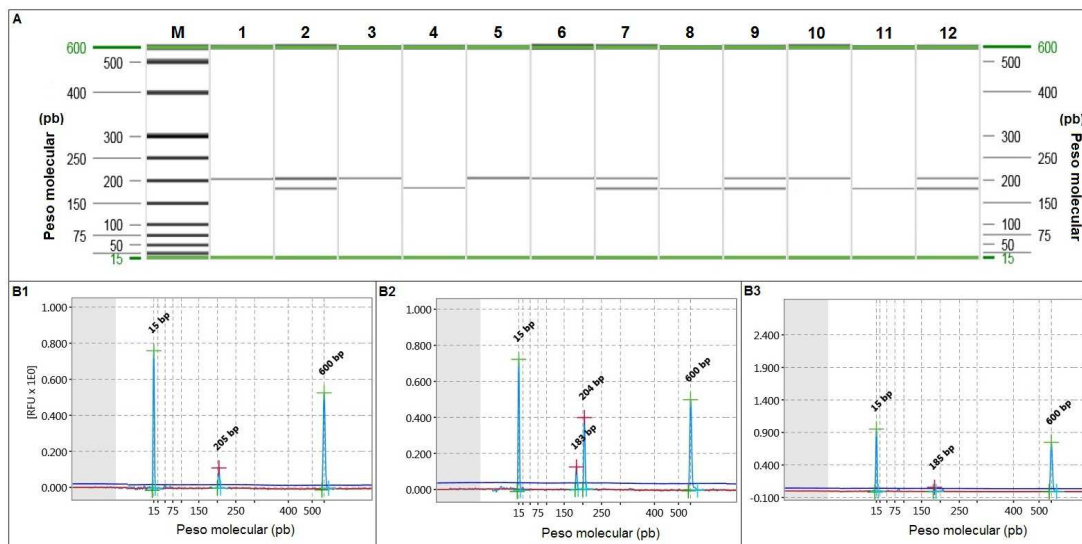


**Figura 7:** Géis representativos de amostras amplificadas por PCR e digeridas com *Hinf I* (RFLP). **A)** Agarose 2%: 3, 4, 5, 7, 8 e 9 - genótipo CC; 1 e 6 - genótipo CT; 2 - genótipo TT. **B)** Poliacrilamida 6%: 3, 4, 6 e 7 - genótipo CC; 1, 2 e 5 - genótipo CT; 8 - genótipo TT. M, marcador de peso molecular de 100pb; C-, controle negativo.

A EC foi realizada no equipamento QIAxcel Advanced<sup>®</sup> (Qiagen), utilizando o método de análise AM420, marcador de alinhamento de 15pb/600pb (QX Alignment Marker<sup>®</sup>, Qiagen) e marcador de peso molecular de 25pb/500pb (QX Size Marker<sup>®</sup>, Qiagen). Para análise, foi necessário no mínimo 10µL de material amplificado e digerido. Após a eletroforese, foram gerados o gel eletrônico (Figura 8A) e o eletroferograma com a intensidade e o tamanho das bandas para cada amostra (Figura 8B).

Na análise: um fragmento de 198pb caracterizou indivíduos CC, dois fragmentos (198pb e 175pb) CT e um fragmento de 175pb, indivíduos TT.

O polimorfismo da MTHFR nas amostras citológicas (n=90, controle) também foi analisado através da técnica de PCR/RFLP e os fragmentos gerados pela restrição enzimática foram avaliados por EP. O protocolo usado para esta análise nas amostras citológicas foi descrito no Anexo 6.



**Figura 8:** Eletroforese capilar. A) Gel eletrônico; M: marcador de peso molecular; 1, 3, 5, 6 e 10 - genótipo CC; 2, 7, 9 e 12 - genótipo CT; 4, 8 e 11 - genótipo TT. B) Eletroferograma; B1) Genótipo CC; B2) Genótipo CT; B3) Genótipo TT.

#### 4.5) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados pelo programa Microsoft Excel<sup>®</sup> 2010 e analisados no SPSS para Windows versão 17.

Estatística descritiva foi realizada para avaliação da frequência dos genótipos da MTHFR e da infecção pelo HPV na população de estudo. Distribuição de frequência, teste  $\chi^2$  e regressão logística binária foram utilizados para a comparação entre os grupos.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) da frequência dos genótipos e dos alelos do gene da enzima MTHFR foi calculado através de uma ferramenta *on-line* (RODRIGUEZ, GAUNT, DAY, 2009).

A comparação entre os métodos de detecção do HPV e genotipagem da MTHFR foi realizada utilizando o coeficiente Kappa ( $\kappa$ ) que varia de 0 a 1 e indica diferentes níveis de concordância: inexistente ( $\kappa < 0,0$ ), muito leve ( $\kappa = 0,0$  a  $0,20$ ), leve ( $\kappa = 0,21$  a  $0,40$ ), moderada ( $\kappa = 0,41$  a  $0,60$ ), substancial ( $\kappa = 0,61$  a  $0,80$ ) e quase perfeita ( $\kappa = 0,81$  a  $1,00$ ) (LANDIS, KOCH, 1977).

O desempenho dos testes utilizados para pesquisa de HPV foi avaliada pelos cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) (Anexo 7).

Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como evidência de associação significativa em todos os testes. Também foi calculado intervalo de confiança de 95%, quando apropriado.

## 5) RESULTADOS

### 5.1) INFECÇÃO POR HPV

Para escolha da melhor técnica para detecção da infecção viral, três metodologias foram testadas: PCR com o par de iniciadores GP5+/GP6+ [PCR (GP5+/GP6+)], com o conjunto de iniciadores SPF [PCR (SPF)] e IHQ. A comparação dos resultados por estes três métodos mostrou que 148 das 150 amostras (98,7%) foram positivas por pelo menos uma das técnicas. Destas, 32 (21,6%) foram HPV positivas em todas as três metodologias, 104 (70,3%) em duas técnicas e 12 (8,1%) em apenas um dos testes (Tabela 6).

Concordância positiva entre os resultados das três análises foi maior em amostras apresentando lesão cervical (25%, n=30) se comparado àquelas sem lesão (7,1%, n=2) (Tabela 6). Resultados similares foram obtidos analisando os graus de lesão (NICs I, II, III e CEI; dados não mostrados). Outra observação a ser destacada foi a maior concordância positiva entre os três resultados nas amostras de mulheres acima de 30 anos (26%, n=25) (Tabela 6).

**TABELA 6:** Concordância positiva entre as metodologias PCR (GP5+/GP6+), PCR (SPF) e IHQ relacionadas ao resultado histopatológicos e à idade.

Técnicas positivas para HPV	Amostras n (%)	Lesão		Idade*	
		Ausente n (%)	Presente n (%)	≤30 anos n (%)	>30 anos n (%)
Pelo menos um	148 (100)	28 (100)	120 (100)	49 (100)	96 (100)
Um	12 (8,1)	6 (21,4)	6 (5)	2 (4,1)	9 (9,4)
Dois	104 (70,3)	20 (71,4)	84 (70)	40 (81,6)	62 (64,6)
Três	32 (21,6)	2 (7,1)	30 (25)	7 (14,3)	25 (26)

\*Três amostras foram excluídas por ausência de dados sobre a idade, portanto n=145 nesta análise.

HPV foi detectado em 134 amostras (89,3%) por IHQ, 37 (24,7%) por PCR (GP5+/GP6+) e 145 (96,7%) por PCR (SPF).

O índice de concordância (Kappa) entre as técnicas foi muito baixo (Tabela 7). O maior índice Kappa calculado foi 0,147 (muito leve) para IHQ e PCR (SPF).

A maioria das amostras avaliadas por PCR (SPF) e IHQ (87,3%, n=131) apresentou infecção viral e apenas 1,3% (n=2) foram HPV negativas (Tabela 7). Em relação aos resultados discordantes entre as duas técnicas (n=17, 11,4%), HPV foi detectado em 9,4% (n=14) das amostras apenas por PCR (SPF), sendo que destas, 5 eram do grupo CEI (35,7%). O contrário ocorreu com 3 amostras

(2,0%), em que a presença do vírus foi encontrada apenas pela técnica de IHQ, duas do grupo controle e uma NIC II.

A positividade para HPV por PCR (GP5+/GP6+) foi de apenas 24,7%, muito baixa se comparada às demais metodologias utilizadas, elevando o grau de discordância entre os testes (Tabela 7).

**TABELA 7:** Análise da concordância e discordância entre as técnicas para detecção do HPV: PCR (SPF), PCR (GP5+/GP6+) e IHQ

Técnica A	Técnica B	Concordância			Discordância			Kappa
		A-/B-	A+/B+	Total	A+/B-	A-/B+	Total	
PCR (SPF)	IHQ	2 (1,3)	131 (87,3)	133 (88,6)	14 (9,4)	3 (2,0)	17 (11,4)	0,147
PCR (SPF)	PCR (GP5+/GP6+)	5 (3,3)	37 (24,7)	42 (28,0)	108 (72,0)	0	108 (72,0)	0,022
PCR (GP5+/GP6+)	IHQ	11 (7,3)	32 (21,3)	43 (28,6)	5 (3,4)	102 (68,0)	107 (71,4)	<0,0

(+): resultado positivo; (-): resultado negativo.

Do total de amostras (n=150), 30 apresentavam cervicite e ausência de coilócitos (células morfológicamente alteradas indicativas da presença do HPV) e 120 tinham alteração histopatológica (NICs I, II, III ou CEI). Considerando o resultado anatomopatológico como padrão-ouro para diagnóstico, foi calculado a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN das técnicas para pesquisa de HPV (Tabela 8).

Dos testes avaliados, PCR (SPF) apresentou maior sensibilidade para a pesquisa de HPV (99,2%) seguida da técnica de IHQ (91,7%). Por outro lado, a sensibilidade da técnica PCR (GP5+/GP6+) foi de apenas 29,2%, muito baixa (Tabela 8).

A probabilidade de uma amostra analisada e com resultado negativo ser realmente negativa (VPN) foi avaliada e PCR (SPF) apresentou o maior VPN (80,0%). As técnicas de IHQ e PCR (GP5+/6+) apresentaram VPN de 37,5% e 24,8%, respectivamente (Tabela 8).

Como a técnica PCR (SPF) apresentou melhores resultados de sensibilidade e VPN (Tabela 8), a mesma foi escolhida para realização das demais análises deste trabalho envolvendo a detecção do HPV.

**TABELA 8:** Desempenho dos testes IHQ e PCR para pesquisa de HPV nas amostras histológicas

Técnica	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)
IHQ	91,7	20,0	82,0	37,5
PCR (GP5+/GP6+)	29,2	93,3	94,6	24,8
PCR (SPF)	99,2	13,3	82,0	80,0

## 5.2) POLIMORFISMO C677T DA MTHFR

### 5.2.1) Comparação das técnicas para análise do genótipo da MTHFR

Os resultados das análises comparativas entre EC, EA ou EP utilizadas para análise do genótipo C677T da enzima MTHFR mostraram concordância quase perfeita entre as metodologias ( $\kappa > 0,9$ ) (Tabela 9). A concordância foi maior entre EA e EP ( $\kappa = 0,971$ ).

Das 150 amostras analisadas, 5 (3,3%) apresentaram resultados discordantes entre as três técnicas utilizadas. Na maioria destas (80%; n=4), a divergência ocorreu entre os genótipos CC e CT. Uma amostra (20%) quando analisada por EA e EP apresentou o genótipo polimórfico (TT), mas genótipo CT no resultado da EC.

**TABELA 9:** Concordância e discordância dos resultados do genótipo da MTHFR obtidos com EC, EA e EP

Técnica A	Técnica B	Concordância n (%)	Discordância n (%)	Kappa
EC <sup>1</sup>	EA <sup>2</sup>	146 (97,3)	4 (2,7)	0,941
EC <sup>1</sup>	EP <sup>3</sup>	146 (97,3)	4 (2,7)	0,940
EA <sup>2</sup>	EP <sup>3</sup>	148 (98,7)	2 (1,3)	0,971

<sup>1</sup>Eletroforese capilar; <sup>2</sup>Eletroforese em gel de agarose; <sup>3</sup>Eletroforese em gel de poliacrilamida.

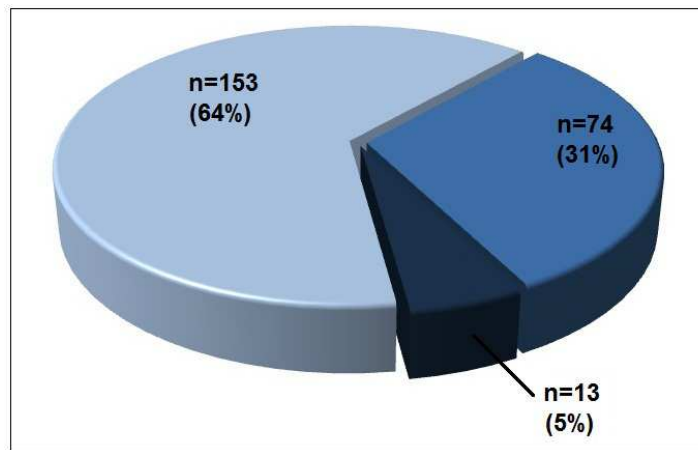
Considerando que a concordância entre as técnicas foi alta e EC é uma técnica mais precisa, que permite a avaliação da intensidade da banda gerada para análise de cada amostra através do eletroferograma (Figura 8B), esta metodologia foi escolhida, neste trabalho, para a análise do polimorfismo da MTHFR e de sua associação com a infecção por HPV e com o risco de desenvolvimento do câncer cervical.

### 5.2.2) Frequência do polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR

A análise do polimorfismo C677T no gene da MTHFR mostrou 64% do genótipo CC (n=153), 31% (n=74) de heterozigotos CT e 5% (n=13) de indivíduos polimórficos TT na amostragem analisada (n=240) (Figura 9).

A distribuição dos genótipos encontrou-se sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg (p=0,312).





**Figura 9:** Frequência dos genótipos da enzima MTHFR. ■ CC; ■ CT; ■ TT.

### 5.2.3) Associação entre o polimorfismo C677T da MTHFR e a infecção por HPV

Independente do genótipo da MTHFR, a infecção pelo HPV foi detectada em 80,8% (n=194) das amostras analisadas (Tabela 10).

Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre a distribuição dos genótipos ou alelos da MTHFR e a presença da infecção pelo HPV. No entanto, foi observada maior porcentagem de indivíduos com o alelo polimórfico (T) sem infecção viral (31,7%) se comparado àqueles apresentando infecção (26,7%) (Tabela 10).

**TABELA 10:** Associação entre o genótipo da MTHFR e a infecção por HPV

Infecção	n (%)	Frequência Genotípica			p	Frequência Alélica		p
		n (%)				%		
		CC	CT	TT		C	T	
HPV-	46 (19,2)	26 (56,5)	17 (37,0)	3 (6,5)	0,526	68,3	31,7	0,423
HPV+	194 (80,8)	127 (65,4)	57 (29,4)	10 (5,2)		73,3	26,7	

### 5.2.4) Associação entre o polimorfismo C677T da MTHFR e as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da cérvix uterina

Observou-se associação estatisticamente significativa entre a distribuição do genótipo ( $p = 0,008$ ) e do alelo ( $p = 0,023$ ) da enzima MTHFR e a presença de lesões intraepiteliais cervicais e carcinoma epidermoide invasor (Tabela 11). Maior frequência de CC foi detectada dentre os casos (n=88, 73,3%) enquanto o contrário foi observado no grupo controle, em que a porcentagem de indivíduos CT (n=46, 38,3%) e TT (n=9, 7,5%) foi maior. Do mesmo modo, maior porcentagem o alelo T foi observada no grupo controle (33,1%) se comparado ao grupo de casos (21,6%).

O risco de desenvolvimento de lesões de acordo com o genótipo da MTHFR foi calculado (*Odds ratio* - OR) e mostrado na Tabela 12. Indivíduos com o alelo T apresentaram risco menor de lesão do que aqueles com o alelo C (OR<1,0). Ou seja, os resultados sugeriram que o alelo T possa agir com um fator de proteção para lesões cervicais (OR: 0,557, IC 95%: 0,335-0,925; p=0,024).

Em relação à gravidade das lesões no colo uterino, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a distribuição dos genótipos (p=0,621) ou dos alelos (p=0,666) da enzima MTHFR (Tabela 13). Também não foi encontrada diferença comparando-se cada um dos grupos (NICs I, II, III e CEI).

**TABELA 11:** Frequência genotípica e alélica da enzima MTHFR em relação às lesões no colo uterino e o risco de desenvolvimento do câncer cervical

Lesão cervical	n	Frequência Genotípica			p	Frequência Alélica		p
		CC	CT	TT		C	T	
Controle	120	65 (54,2)	46 (38,3)	9 (7,5)	0,008	66,9	33,1	0,023
Casos	120	88 (73,3)	28 (23,3)	4 (3,4)		78,4	21,6	

**TABELA 12:** Risco de desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas na cérvix uterina de acordo com o polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR

MTHFR	OR (IC95%)	p
<b>Genótipo</b>		
CC	1,0	
CT	0,450 (0,255-0,794)	0,006
TT	0,328 (0,097-1,113)	0,074
<b>Alelo</b>		
C	1,0	
T	0,557 (0,335-0,925)	0,024

**TABELA 13:** Associação entre o genótipo da enzima MTHFR e a gravidade da lesão cervical

Lesão cervical	n	Frequência Genotípica			p	Frequência Alélica		p
		CC	CT	TT		C	T	
Controle*	30	17 (56,7)	11 (36,7)	2 (6,6)		68,3	31,7	
NIC I	30	22 (73,3)	7 (23,3)	1 (3,4)		78,4	21,6	
NIC II	30	21 (70,0)	9 (30,0)	0	0,621	76,9	23,1	0,666
NIC III	30	21 (70,0)	7 (23,3)	2 (6,7)		75,7	24,3	
CEI	30	24 (80,0)	5 (16,6)	1 (3,4)		82,9	17,1	

\*Para comparação entre os grupos, foram incluídas apenas as 30 amostras histológicas no grupo controle.

Para avaliar o efeito da idade na associação do polimorfismo C677T no gene da enzima da MTHFR com o desenvolvimento do câncer cervical, inicialmente as amostras foram divididas em

dois grupos etários:  $\leq 30$  anos e  $>30$ anos. Os resultados mostraram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre a distribuição do genótipo e do alelo da enzima MTHFR e a presença de lesões cervicais entre mulheres com idade superior a 30 anos, sendo observada maior frequência do alelo polimórfico (T) no grupo controle (34,5%) (Tabela 14).

De maneira semelhante, a maioria das mulheres com idade  $\leq 30$  anos com o alelo polimórfico não apresentava lesão cervical. No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 14).

Desta forma, o risco de desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas ou do câncer cervical foi calculado apenas para mulheres com idade superior a 30 anos. Como pode ser observado na Tabela 15, foi constatado menor risco de mulheres nesta faixa etária possuindo o alelo T apresentarem lesão cervical (OR: 0,521; IC 95%: 0,280-0,971;  $p=0,040$ ).

**TABELA 14:** Associação entre o genótipo da enzima MTHFR e a presença de lesões cervicais de acordo com a idade\*

Idade		Frequência Genotípica			p	Frequência Alélica		p
		n (%)				%		
		CC	CT	TT		C	T	
$\leq 30$ anos	Controle	20 (58,8)	13 (38,3)	1 (2,9)	0,416	70,2	29,8	0,351
	Casos	30 (73,2)	10 (24,4)	1 (2,4)		78,4	21,6	
$>30$ anos	Controle	45(52,3)	33 (38,4)	8 (9,3)	0,018	65,5	34,5	0,039
	Casos	56 (73,7)	17 (22,4)	3 (3,9)		78,5	21,5	

\*Foram excluídas 3 amostras por ausência de dados sobre a idade, levando à diminuição da amostragem total (n=237).

**TABELA 15:** Risco de desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas na cérvix uterina de acordo com o polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR em mulheres com idade  $>30$  anos

MTHFR	OR (IC95%)	p
<b>Genótipo</b>		
CC	1,0	
CT	0,414 (0,205-0,837)	0,014
TT	0,301 (0,076-1,202)	0,089
<b>Alelo</b>		
C	1,0	
T	0,521 (0,280-0,971)	0,040

## 6) DISCUSSÃO

### 6.1) METODOLOGIAS PARA PESQUISA DE HPV E GENOTIPAGEM DA MTHFR

Apesar da utilização de material parafinado ser uma importante ferramenta para estudos retrospectivos com amostras que constituem arquivos de laboratórios anatomopatológicos, a realização de técnicas de biologia molecular neste tipo de amostra pode ser prejudicada. Isto acontece porque durante o processo de fixação do tecido podem ocorrer danos irreversíveis ao material genético, dificultando a amplificação do DNA por PCR (QUACH, GOODMAN, SHIBATA, 2004; ALVAREZ-ALDANA, MARTÍNEZ, SEPÚLVEDA-ARIAS, 2015).

Além disso, a fixação e a parafinização das amostras induzem a formação de ligações cruzadas entre DNA-DNA e DNA-proteína, acarretando no aumento de impurezas no material extraído. Quando se usa formol como fixador, pode ocorrer a fragmentação do material genético, tanto pelas condições de fixação (tempo, temperatura e pH), quanto pelo tempo e forma de armazenamento da amostra (QUACH, GOODMAN, SHIBATA, 2004; ALVAREZ-ALDANA, MARTÍNEZ, SEPÚLVEDA-ARIAS, 2015). Com isto, no momento da amplificação do DNA por PCR, podem surgir mutações devido aos danos e às modificações nos nucleotídeos, levando à incorporação errônea de dNTPs pela *Taq* polimerase (FELDMAN, 1973; GOODMAN, TIPPIN, 2000; GOODMAN, 2002).

Considerando as dificuldades técnicas de se trabalhar com material parafinado, na pesquisa torna-se importante a padronização das metodologias e avaliação criteriosa do material por diferentes técnicas.

#### 6.1.1) HPV

A técnica de PCR é bastante sensível e constitui a base dos testes moleculares (SHEN, YANG, JIANG, 2014). Os iniciadores genéricos MY09/MY11 e GP5+/GP6+ são os mais utilizados para detecção do HPV por PCR. Neste trabalho, no entanto, melhores resultados foram obtidos utilizando o conjunto de iniciadores SPF. Além disso, não houve amplificação do DNA do HPV com os iniciadores MY09/MY11 (resultados não mostrados) e em relação a GP5+/GP6+, apesar de ter se observado amplificação, a técnica apresentou baixa sensibilidade. Resultados similares foram obtidos em outros estudos (BAAY *et al.*, 1996; REN *et al.*, 2000; CHAN *et al.*, 2001; LESNIKOVA *et al.*, 2010; ALVAREZ-ALDANA, MARTÍNEZ, SEPÚLVEDA-ARIAS, 2015).

A utilização de MY09/MY11 e GP5+/GP6+ para pesquisa do vírus em material parafinado pode levar a resultados insatisfatórios, pois os fragmentos de DNA produzidos pelos mesmos são relativamente grandes (450pb e 160pb, respectivamente). Por outro lado, o conjunto de iniciadores SPF gera um fragmento de apenas 65pb, tornando maior a chance de detecção do HPV em amostras com o DNA potencialmente degradado, como é o caso das amostras parafinadas (IFTNER, VILLA, 2003; FENG *et al.*, 2013).

Outra metodologia disponível para pesquisa do HPV é IHQ. Esta é menos utilizada por sua menor eficácia de detecção do vírus devido às características da técnica, como a marcação de fundo (*background*), que diminui a especificidade, e a análise realizada por microscopia, que além de ser trabalhosa, é subjetiva (GIBSON, 2014). No entanto, os resultados obtidos com a técnica IHQ para pesquisa do HPV permitem analisar mais especificamente a fase produtiva da infecção, enquanto aqueles obtidos usando PCR seriam também associados à fase de transformação. Nas amostras utilizadas neste trabalho, a detecção do HPV por IHQ mostrou alta positividade viral principalmente nas fases iniciais da infecção (PITOL, 2012). Da mesma forma, outros estudos demonstraram que a taxa de expressão IHQ da proteína L1 do HPV diminui com a progressão da infecção viral ao câncer (YOSHIDA *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2010).

Neste trabalho, a concordância entre IHQ e PCR (SPF) foi muito leve. Maior porcentagem das amostras em que a infecção viral foi detectada apenas por IHQ pertencia ao grupo controle, enquanto a maioria daquelas em que a pesquisa do HPV foi positiva apenas por PCR (SPF) apresentavam CEI. Isto pode ser explicado pelo fato da IHQ detectar a presença do vírus apenas na fase produtiva da infecção, em que o DNA viral encontra-se episossomal, havendo a replicação do material genético do vírus, a síntese do seu capsídeo proteico e a liberação de novas partículas virais. Por outro lado, na fase de transformação, a expressão de L1 encontra-se diminuída, devido à integração do material genético viral no DNA do hospedeiro.

Não foram encontrados estudos similares comparando a análise de HPV por PCR (SPF), PCR (GP5+/GP6+) e IHQ nas mesmas amostras biológicas. Apesar de muitos estudos apresentarem concordância entre o teste avaliado e a presença de lesões cervicais, que sugere a presença do vírus, poucos avaliaram a positividade da infecção por HPV em uma mesma amostra utilizando metodologias diferentes (POLJAK *et al.*, 2012; GIBSON, 2014; REBOLJ *et al.*, 2014).

Estes estudos de comparação de metodologias são complexos devido à inexistência de um teste padrão-ouro para pesquisa do HPV. Neste trabalho, com o intuito de calcular sensibilidade, especificidade, VPP e VPN, o resultado histopatológico foi utilizado como padrão-ouro. Entretanto, a histologia avalia, mais especificamente, alterações morfológicas e não a infecção viral. Amostras sem lesão apresentando apenas cervicite podem ser positivas para HPV, gerando um problema com

o controle negativo. Isto torna os resultados de sensibilidade obtidos neste trabalho mais confiáveis que aqueles de especificidade.

### 6.1.2) Genotipagem da MTHFR

A concordância entre as metodologias utilizadas neste estudo para genotipagem da MTHFR foi quase perfeita, tendo sido observadas diferenças na frequência dos genótipos de acordo com cada uma das técnicas em apenas 5 amostras. Esta leve discordância de resultados se deve, muito provavelmente, à pequena diferença entre o tamanho dos fragmentos gerados pela RFLP (198pb e 175pb), que dificulta a análise visual dos géis de agarose e poliacrilamida. Além disso, a qualidade do material amplificado pode ter interferido nas análises.

A discordância, embora muito pequena, pode refletir fortemente nos resultados de estudos de associação do polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR com o câncer cervical, principalmente em trabalhos com o n amostral pequeno. Isto porque a frequência de TT, que leva à diminuição da atividade enzimática da MTHFR, é baixa na população. Ou seja, em estudos com n amostral pequeno, como é o caso deste trabalho, o erro na genotipagem de uma (1) amostra pode influenciar o resultado de associação estatística entre o polimorfismo e o câncer. Portanto, a técnica a ser utilizada deve ser escolhida com cuidado, principalmente se o n amostral for pequeno.

Não foi encontrado nenhum estudo em que a genotipagem da MTHFR tenha sido realizada por PCR/RFLP com análise por EC, uma metodologia relativamente nova. No entanto, esta técnica é capaz de mensurar com rapidez e precisão o tamanho e a intensidade das bandas geradas por RFLP (THOMAS *et al.*, 2010).

## 6.2) FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO C677T NO GENE DA MTHFR

Poucos estudos foram encontrados na literatura avaliando a frequência do polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR e sua associação com o câncer cervical. Estes foram realizados com as populações asiática, europeia e americana. De modo geral, foram observadas frequências bastante distintas do alelo polimórfico (7,5% a 76%) que devem ser analisadas considerando o país em que o trabalho foi realizado, etnia, a metodologia utilizada para genotipagem e o n amostral. O Anexo 8 compila os resultados de estudos de frequência dos genótipos da MTHFR e de associação entre o polimorfismo C677T no gene desta enzima e o câncer cervical.

Este trabalho, realizado com 240 amostras cervicais, mostrou frequência de 36% de CT+TT e 5% de TT. Tomita e colaboradores (2013) encontraram frequências maiores (50,5% de CT+TT e 6,5% de TT) analisando 947 amostras sanguíneas de mulheres brasileiras residentes em São Paulo, SP por PCR em tempo real. A variação na metodologia e no n amostral pode explicar a diferença de frequência do alelo polimórfico entre os estudos.

Frequências dos genótipos da MTHFR similares a deste trabalho foram obtidas com a população norte-americana (HENAO *et al.*, 2005; PIYATHILAKE *et al.*, 2007) e indiana (NANDAN *et al.*, 2008).

Na população europeia os estudos mostraram frequências similares independente do país avaliado, n amostral ou metodologia utilizada: CT+TT variou de 49% a 57% e TT de 7% a 11% (LAMBROPOULOS *et al.*, 2003; ZOODSMA *et al.*, 2005; MOSTOWSKA *et al.*, 2011; VON KEYSERLING *et al.*, 2011; BOTEZATU *et al.*, 2013).

Em relação à população americana, a variação observada foi de 29% a 76% de CT+TT e de 3,5% a 24% de TT. A maioria dos trabalhos foi realizada nos Estados Unidos. Maiores frequências de CT+TT e TT foram observadas em estudos com um n amostral pequeno (PIYATHILAKE *et al.*, 2000; GOODMAN *et al.*, 2001; HENAO *et al.*, 2005; DELGADO-ENCISO *et al.*, 2006; PIYATHILAKE *et al.*, 2007; TOMITA *et al.*, 2013; BADIGA *et al.*, 2014).

Por outro lado, maiores variações de frequência do genótipo da MTHFR foram observadas na população asiática (CT+TT de 7,5% a 69% e TT de 0,6% a 21%). Entretanto, se a frequência dos genótipos da MTHFR for avaliada considerando as populações indiana e sul-coreana separadamente, maior homogeneidade é observada. Na Coreia do Sul, o genótipo CT+TT variou de 63% a 69% e TT de 18% a 21% (SULL *et al.*, 2004; KANG *et al.*, 2005; TONG *et al.*, 2011). Na Índia, houve variação de 7,5% a 36% de CT+TT e de 0,6% a 2% de TT (NANDAN *et al.*, 2008; SHEKARI *et al.*, 2008b; KOHAAR *et al.*, 2010; PRASAD, WILKHOO, 2011).

### 6.3) POLIMORFISMO C677T NO GENE DA ENZIMA MTHFR E O DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER CERVICAL

Neste estudo, o efeito do polimorfismo C677T da MTHFR na carcinogênese cervical foi avaliado frente à infecção por HPV e às lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da cérvix uterina.

Em relação ao HPV, não foi observada associação entre a infecção viral e o polimorfismo C677T no gene da MTHFR. Resultados similares foram obtidos em trabalhos com a população indiana (NANDAN *et al.*, 2008; KOHAAR *et al.*, 2010). No entanto, estudos realizados com

mulheres norte-americanas e romenas indicaram a presença do polimorfismo C677T como um fator de risco para a infecção por HPV (GOODMAN *et al.*, 2001; BOTEZATU *et al.*, 2013).

Por outro lado, neste trabalho a análise da associação do polimorfismo C677T da MTHFR com as lesões intraepiteliais e com o câncer cervical mostrou que a presença do alelo T foi mais frequente em mulheres sem lesão, sugerindo que o alelo polimórfico possa agir como um fator de proteção para esta neoplasia em mulheres brasileiras. Entretanto, os resultados devem ser interpretados considerando as limitações que este estudo apresenta.

Trabalhos realizados com a população norte-americana e com frequência do alelo polimórfico similar a deste estudo, também indicaram a presença do polimorfismo como um fator de proteção para o desenvolvimento do câncer cervical (HENAO *et al.*, 2005; PIYATHILAKE *et al.*, 2007).

Contudo, outros trabalhos apontaram a presença do polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR como um fator de risco para o câncer cervical (PIYATHILAKE *et al.*, 2000; SULL *et al.*, 2004; ZOODSMA *et al.*, 2005; NANDAN *et al.*, 2008; VON KEYSERLING *et al.*, 2011; MEI *et al.*, 2012; BOTEZATU *et al.*, 2013; TOMITA *et al.*, 2013).

Meta-análises constataram que a forma como o polimorfismo C677T da MTHFR se associa à carcinogênese cervical varia de acordo com a etnia, agindo como um fator de risco para asiáticas (GUO, 2012; WU *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2013) e como um fator de proteção para caucasianas (LUO *et al.*, 2012; ZHUO *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2013).

Ainda, outros estudos não encontraram nenhuma relação entre o polimorfismo C677T MTHFR e o câncer no colo uterino (LAMBROPOULOS *et al.*, 2003; DELGADO-ENCISO *et al.*, 2006; KOHAAR *et al.*, 2010; MOSTOWSKA *et al.*, 2011; PRASAD, WILKHOO, 2011; LONG *et al.*, 2012; XU, ZOU E WANG, 2013; BADIGA *et al.*, 2014).

Desta forma, vários trabalhos tentaram elucidar o papel do polimorfismo C677T da MTHFR no desenvolvimento do câncer cervical, mas os resultados ainda são controversos e inconclusivos, e variam de acordo com a etnia (GUO, 2012; LONG *et al.*, 2012; LUO *et al.*, 2012; MEI *et al.*, 2012; ZHUO *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2013). Como exposto, a frequência do genótipo polimórfico é pequena na maioria dos estudos e a variabilidade no n amostral e na metodologia utilizadas podem levar a grandes alterações na sua frequência, o que pode explicar esta controvérsia (Anexo 8).

A idade é uma variável que também pode ser considerada. O desenvolvimento do câncer cervical se inicia com a infecção pelo HPV de alto risco oncogênico, principal cofator desta neoplasia. Caso a infecção persista por 1 ou 2 anos, pode haver o surgimento de lesões cervicais. Apenas cerca de 10% destas infecções progridem, levando ao surgimento de lesões de baixo grau, e aproximadamente 2% das mulheres infectadas apresentam lesão cervical de alto grau após anos de infecção persistente. Normalmente, as lesões de alto grau se expandem lateralmente ao redor da



zona de transformação na região cervical, levando décadas até a invasão do tecido e o surgimento do carcinoma epidermoide invasor (SCHIFFMAN, WENTZENSEN, 2013).

Assim, há faixas etárias mais comuns para cada fase do desenvolvimento do câncer no colo uterino, sendo que o pico da infecção pelo HPV ocorre durante a adolescência e o início da vida adulta, enquanto a maior incidência de lesões de alto grau é observada em mulheres com idade entre 25 e 35 anos. Já o carcinoma ocorre predominantemente entre os 45 e 60 anos de idade (SCHIFFMAN, WENTZENSEN, 2013).

Neste estudo, observou-se diferença estatisticamente significativa da distribuição do genótipo da MTHFR entre casos e controles apenas no grupo de mulheres com idade superior a 30 anos, em que se constatou maior frequência do alelo polimórfico dentre aquelas sem lesão na cérvix uterina, reforçando o resultado de que a presença do polimorfismo age como um fator de proteção para a carcinogênese cervical. Assim, a presença do alelo polimórfico em mulheres mais velhas seria um fator de proteção em um momento em que há maior risco do surgimento de lesões cervicais pela história natural da infecção pelo HPV.

Por outro lado, Sull e colaboradores (2004) concluíram que a presença do genótipo polimórfico aumenta o risco de desenvolvimento desta neoplasia em mulheres coreanas mais jovens, com idade inferior a 40 anos.

Novamente, estes resultados devem ser interpretados com cautela considerando que existem muitas outras variáveis, além da idade, que interferem na remissão e/ou progressão da infecção ao câncer cervical.

#### 6.4) LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Uma das limitações deste trabalho foi o n amostral utilizado, dificultando a análise estatística devido ao pequeno número de amostras com o genótipo polimórfico TT.

Além disso, a ausência de dados sobre outros cofatores para a carcinogênese cervical, como o início da atividade sexual, número de parceiros, multiparidade, tabagismo e etilismo, presença de outras doenças sexualmente transmissíveis, além de outros cofatores genéticos também são limitações que devem ser consideradas.

Ainda, a ausência de dados sobre a concentração sérica de folato das participantes deve ser levada em conta, uma vez que o efeito do polimorfismo C677T no gene da MTHFR sobre a infecção pelo HPV e o desenvolvimento do câncer cervical pode ser alterado pelos níveis deste micronutriente (TONG *et al.*, 2011; BADIGA *et al.*, 2014). A presença do polimorfismo associada a baixos níveis de folato leva a alterações no padrão de metilação do DNA não só do hospedeiro

como também do HPV, o que acarreta alteração da expressão gênica, podendo favorecer a persistência da infecção. Além disso, a integridade do DNA pode ficar comprometida, aumentando as chances de integração do material genético do HPV no DNA do hospedeiro, processo fundamental para progressão da infecção ao câncer (PETER *et al.*, 2010; MEI *et al.*, 2012).

Quando os níveis de folato estão elevados, indivíduos apresentando o genótipo TT não têm a metilação biológica alterada, uma vez que a conversão de 5,10-metilenoTHF a 5-metilTHF fica preservada. Assim, quando os níveis de folato são suficientes, a menor atividade da MTHFR em indivíduos com o genótipo polimórfico provavelmente é uma vantagem no que diz respeito à prevenção ao câncer, devido à garantia de síntese satisfatória de nucleotídeos (KIM, 2009). Por outro lado, nas situações de deficiência deste micronutriente, a alta atividade enzimática de MTHFR em indivíduos CC pode ser uma desvantagem, aumentando a chance do desenvolvimento de neoplasias, devido à alta taxa de conversão de 5,10-metilenoTHF a 5-metilTHF, o que compromete a síntese de nucleotídeos (KEKU *et al.*, 2002).

## **7) CONCLUSÃO**

A presença do alelo polimórfico parece agir como um fator de proteção para lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da cérvix uterina, principalmente em mulheres com idade superior a 30 anos. Por outro lado, o polimorfismo C677T no gene da MTHFR não está associado à infecção pelo HPV.

## 8) REFERÊNCIAS

- ABECASIS, G. R. *et al.* An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*, v. 491, n. 7422, p. 56-65, Nov 2012.
- ALTSHULER, D. M. *et al.* Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature*, v. 467, n. 7311, p. 52-8, Sep 2010.
- ALVAREZ-ALDANA, A.; MARTÍNEZ, J. W.; SEPÚLVEDA-ARIAS, J. C. Comparison of five protocols to extract DNA from paraffin-embedded tissues for the detection of human papillomavirus. *Pathol Res Pract*, v. 211, n. 2, p. 150-5, Feb 2015.
- AYRES, A. R.; SILVA, G. A. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. *Rev Saude Publica*, v. 44, n. 5, p. 963-74, Oct 2010.
- BAAY, M. F. *et al.* Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *J Clin Microbiol*, v. 34, n. 3, p. 745-7, Mar 1996.
- BADIGA, S. *et al.* A lower degree of PBMC L1 methylation in women with lower folate status may explain the MTHFR C677T polymorphism associated higher risk of CIN in the US post folic acid fortification era. *PLoS One*, v. 9, n. 10, p. e110093, 2014.
- BAG, A.; JYALA, N. S.; BAG, N. Indian studies on genetic polymorphisms and cancer risk. *Indian J Cancer*, v. 49, n. 1, p. 144-62, 2012 Jan-Mar 2012.
- BERNARD, H. U. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir Ther*, v. 7, n. 4, p. 219-37, Dec 2002.
- BERNARD, H. U. *et al.* Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, v. 401, n. 1, p. 70-9, May 2010.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, v. 16, n. 1, p. 6-21, Jan 2002.
- BOSCH, F. X. *et al.* Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine*, v. 31 Suppl 6, p. G1-31, Dec 2013.
- BOTEZATU, A. *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and promoter methylation in cervical oncogenic lesions and cancer. *J Cell Mol Med*, v. 17, n. 4, p. 543-9, Apr 2013.
- BOULET, G. *et al.* Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 39, n. 11, p. 2006-11, 2007.
- BOUVARD, V. *et al.* A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol*, v. 10, n. 4, p. 321-2, Apr 2009.

- BURD, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*, v. 16, n. 1, p. 1-17, Jan 2003.
- BURK, R. D.; HARARI, A.; CHEN, Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology*, v. 445, n. 1-2, p. 232-43, Oct 2013.
- CASON, J.; MANT, C. A. High-risk mucosal human papillomavirus infections during infancy & childhood. *J Clin Virol*, v. 32 Suppl 1, p. S52-8, Mar 2005.
- CASTELLSAGUÉ, X. *et al.* Human Papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes: a prospective study in Spain. *BMC Infect Dis*, v. 9, p. 74, 2009.
- CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*, n. 31, p. 20-8, 2003.
- CASTLE, P. E. *et al.* A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis*, v. 191, n. 11, p. 1808-16, Jun 2005.
- CHAN, P. K. *et al.* Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. *J Clin Pathol*, v. 54, n. 5, p. 401-3, May 2001.
- CHATTERJEE, K. *et al.* Fas and FasL gene polymorphisms are not associated with cervical cancer but differ among Black and Mixed-ancestry South Africans. *BMC Res Notes*, v. 2, p. 238, 2009.
- CHOI, S. W.; MASON, J. B. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr*, v. 130, n. 2, p. 129-32, Feb 2000.
- CROTHERS, B. A. *et al.* False-positive Papanicolaou (PAP) test rates in the College of American Pathologists PAP education and PAP proficiency test programs: evaluation of false-positive responses of high-grade squamous intraepithelial lesion or cancer to a negative reference diagnosis. *Arch Pathol Lab Med*, v. 138, n. 5, p. 613-9, May 2014.
- D'ABRAMO, C. M.; ARCHAMBAULT, J. Small molecule inhibitors of human papillomavirus protein - protein interactions. *Open Virol J*, v. 5, p. 80-95, 2011.
- DE RODA HUSMAN, A. M. *et al.* The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*, v. 76 ( Pt 4), p. 1057-62, Apr 1995.
- DE SANJOSÉ, S. *et al.* Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, v. 7, n. 7, p. 453-9, Jul 2007.
- DE VILLIERS, E. M. *et al.* Classification of papillomaviruses. *Virology*, v. 324, n. 1, p. 17-27, Jun 2004.
- DE VILLIERS, E. M.; GUNST, K. Characterization of seven novel human papillomavirus types isolated from cutaneous tissue, but also present in mucosal lesions. *J Gen Virol*, v. 90, n. Pt 8, p. 1999-2004, Aug 2009.

- DELGADO-ENCISO, I. *et al.* [The effect of MTHFR polymorphisms, pregnancy and first intercourse on cervical cancer in a population from the Northeastern Mexico]. *Rev Invest Clin*, v. 58, n. 5, p. 462-9, 2006 Sep-Oct 2006.
- DIMAIO, D.; MATTOON, D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene*, v. 20, n. 54, p. 7866-73, Nov 2001.
- DONALDSON, K. O.; KERESZTESY, J. C. Naturally occurring forms of folic acid. II. Enzymatic conversion of methylenetetrahydrofolic acid to prefolic A-methyl-tetrahydrofolate. *J Biol Chem*, v. 237, p. 1298-304, Apr 1962.
- DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*, v. 110, n. 5, p. 525-41, May 2006.
- DOORBAR, J. *et al.* The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, v. 30 Suppl 5, p. F55-70, Nov 2012.
- DUENSING, A. *et al.* Centriole overduplication through the concurrent formation of multiple daughter centrioles at single maternal templates. *Oncogene*, v. 26, n. 43, p. 6280-8, Sep 2007.
- DUENSING, S.; MÜNGER, K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer*, v. 109, n. 2, p. 157-62, Mar 2004.
- FANG, J.; ZHANG, H.; JIN, S. Epigenetics and cervical cancer: from pathogenesis to therapy. *Tumour Biol*, v. 35, n. 6, p. 5083-93, Jun 2014.
- FELDMAN, M. Y. Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, v. 13, p. 1-49, 1973.
- FENG, S. *et al.* Human papillomavirus was not detected by PCR using multiple consensus primer sets in esophageal adenocarcinomas in Chinese patients. *J Med Virol*, v. 85, n. 6, p. 1053-7, Jun 2013.
- FORSLUND, O. Genetic diversity of cutaneous human papillomaviruses. *J Gen Virol*, v. 88, n. Pt 10, p. 2662-9, Oct 2007.
- FOX, J. T.; STOVER, P. J. Folate-mediated one-carbon metabolism. *Vitam Horm*, v. 79, p. 1-44, 2008.
- FRAZER, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol*, v. 4, n. 1, p. 46-54, Jan 2004.
- FRAZER, I. H.; LEGGATT, G. R.; MATTAROLLO, S. R. Prevention and treatment of papillomavirus-related cancers through immunization. *Annu Rev Immunol*, v. 29, p. 111-38, 2011.
- FREITAS, A. C. *et al.* Human papillomavirus vertical transmission: review of current data. *Clin Infect Dis*, v. 56, n. 10, p. 1451-6, May 2013.
- FROSST, P. *et al.* A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*, v. 10, n. 1, p. 111-3, May 1995.
- GANGWAR, R. *et al.* Genetic variants of DNA repair gene XPC modulating susceptibility to cervical cancer in North India. *Oncol Res*, v. 18, n. 7, p. 329-35, 2010.

- GAVILLON, N. *et al.* [How did I contract human Papillomavirus (HPV)?]. *Gynecol Obstet Fertil*, v. 38, n. 3, p. 199-204, Mar 2010.
- GIBSON, J. S. Nucleic acid-based assays for the detection of high-risk human papillomavirus: a technical review. *Cancer Cytopathol*, v. 122, n. 9, p. 639-45, Sep 2014.
- GIROGLOU, T. *et al.* Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol*, v. 75, n. 3, p. 1565-70, Feb 2001.
- GOODMAN, M. F. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem*, v. 71, p. 17-50, 2002.
- GOODMAN, M. F.; TIPPIN, B. Sloppier copier DNA polymerases involved in genome repair. *Curr Opin Genet Dev*, v. 10, n. 2, p. 162-8, Apr 2000.
- GOODMAN, M. T. *et al.* Association of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and dietary folate with the risk of cervical dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 10, n. 12, p. 1275-80, Dec 2001.
- GRAVITT, P. E. *et al.* Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*, v. 38, n. 1, p. 357-61, Jan 2000.
- GUO, L. N. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and cervical cancer risk: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*, v. 13, n. 5, p. 2193-7, 2012.
- HENAO, O. L. *et al.* Women with polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase (MS) are less likely to have cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 2 or 3. *Int J Cancer*, v. 113, n. 6, p. 991-7, Mar 2005.
- HOSTE, G.; VOSSAERT, K.; POPPE, W. A. The Clinical Role of HPV Testing in Primary and Secondary Cervical Cancer Screening. *Obstet Gynecol Int*, v. 2013, p. 610373, 2013.
- HUANG, M. Z. *et al.* An analysis on the combination expression of HPV L1 capsid protein and p16INK4a in cervical lesions. *Diagn Cytopathol*, v. 38, n. 8, p. 573-8, Aug 2010.
- HUH, W. K. *et al.* Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: Interim clinical guidance. *Gynecol Oncol*, Jan 2015.
- HUMANS, I. W. G. O. T. E. O. C. R. T. Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, v. 64, p. 1-378, 1995.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. *Globocan 2012: Cancer Incidence and Mortality in 2012*. France: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization 2012.
- IFTNER, T.; VILLA, L. L. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr*, n. 31, p. 80-8, 2003.
- INCA, Instituto Nacional do Câncer. *Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero*. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde: 104 p. 2011.
- INCA, Instituto Nacional do Câncer. *Estimativa 2014 - Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde 2013.

- INCA, Instituto Nacional do Câncer. Atlas On-line de Mortalidade. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde 2014.
- INCA, Instituto Nacional do Câncer. Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais e Condutas Preconizadas - Recomendações para profissionais de saúde. Revista Brasileira de Cancerologia: Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. 52: 213-236 p. 2006.
- INSINGA, R. P. *et al.* Incidence, duration, and reappearance of type-specific cervical human papillomavirus infections in young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 19, n. 6, p. 1585-94, Jun 2010.
- JEMAL, A. *et al.* Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011 Mar-Apr 2011.
- KANG, S. *et al.* Polymorphism in folate- and methionine-metabolizing enzyme and aberrant CpG island hypermethylation in uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol*, v. 96, n. 1, p. 173-80, Jan 2005.
- KEKU, T. *et al.* 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in African Americans and whites. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 11, n. 12, p. 1611-21, Dec 2002.
- KIM, Y. I. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and pharmacogenetics: a new role of single nucleotide polymorphisms in the folate metabolic pathway in human health and disease. *Nutr Rev*, v. 63, n. 11, p. 398-407, Nov 2005.
- KIM, Y. I. Role of the MTHFR polymorphisms in cancer risk modification and treatment. *Future Oncol*, v. 5, n. 4, p. 523-42, May 2009.
- KJELLBERG, L. *et al.* Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer*, v. 82, n. 7, p. 1332-8, Apr 2000.
- KLETER, B. *et al.* Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol*, v. 153, n. 6, p. 1731-9, Dec 1998.
- KOHAAR, I. *et al.* Homocysteine levels are associated with cervical cancer independent of methylene tetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) polymorphisms in Indian population. *Biomarkers*, v. 15, n. 1, p. 61-8, Feb 2010.
- LAI, H. C. *et al.* Genetic polymorphisms of FAS and FASL (CD95/CD95L) genes in cervical carcinogenesis: An analysis of haplotype and gene-gene interaction. *Gynecol Oncol*, v. 99, n. 1, p. 113-8, Oct 2005.
- LAMBROPOULOS, A. F. *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T is not associated to the risk of cervical dysplasia. *Cancer Lett*, v. 191, n. 2, p. 187-91, Mar 2003.
- LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, v. 33, n. 1, p. 159-74, Mar 1977.
- LEE, S. A. *et al.* Genetic polymorphisms of GSTM1, p21, p53 and HPV infection with cervical cancer in Korean women. *Gynecol Oncol*, v. 93, n. 1, p. 14-8, Apr 2004.



- LESNIKOVA, I. *et al.* Rapid, sensitive, type specific PCR detection of the E7 region of human papillomavirus type 16 and 18 from paraffin embedded sections of cervical carcinoma. *Infect Agent Cancer*, v. 5, p. 2, 2010.
- LETO, M. *et al.* Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *An Bras Dermatol*, v. 86, n. 2, p. 306-17, 2011 Mar-Apr 2011.
- LONG, S. *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and susceptibility for cervical lesions: a meta-analysis. *PLoS One*, v. 7, n. 12, p. e52381, 2012.
- LUO, Y. L. *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and susceptibility to cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia: a meta-analysis. *PLoS One*, v. 7, n. 9, p. e46272, 2012.
- LÖRINCZ, A. T. Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. *J Obstet Gynaecol Res*, v. 22, n. 6, p. 629-36, Dec 1996.
- MA, J. *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res*, v. 57, n. 6, p. 1098-102, Mar 1997.
- MAGNUSSON, P. K.; LICHTENSTEIN, P.; GYLLENSTEN, U. B. Heritability of cervical tumours. *Int J Cancer*, v. 88, n. 5, p. 698-701, Dec 2000.
- MARCHETTI, B. *et al.* Bovine papillomavirus type 1 oncoprotein E5 inhibits equine MHC class I and interacts with equine MHC I heavy chain. *J Gen Virol*, v. 90, n. Pt 12, p. 2865-70, Dec 2009.
- MCMURRAY, H. R. *et al.* Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol*, v. 82, n. 1, p. 15-33, Feb 2001.
- MEI, Q. *et al.* The association between MTHFR 677C>T polymorphism and cervical cancer: evidence from a meta-analysis. *BMC Cancer*, v. 12, p. 467, 2012.
- MITRA, S. *et al.* Association of specific genotype and haplotype of p53 gene with cervical cancer in India. *J Clin Pathol*, v. 58, n. 1, p. 26-31, Jan 2005.
- MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*, v. 10, n. 8, p. 550-60, Aug 2010.
- MOSCICKI, A. B. *et al.* Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. *Vaccine*, v. 30 Suppl 5, p. F24-33, Nov 2012.
- MOSTOWSKA, A. *et al.* Folate and choline metabolism gene variants and development of uterine cervical carcinoma. *Clin Biochem*, v. 44, n. 8-9, p. 596-600, Jun 2011.
- MUÑOZ, N. *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, v. 348, n. 6, p. 518-27, Feb 2003.
- MUÑOZ, N. *et al.* Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, v. 24 Suppl 3, p. S3/1-10, Aug 2006.
- MÜNGER, K.; HOWLEY, P. M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*, v. 89, n. 2, p. 213-28, Nov 2002.

- NAKAGAWA, J. T.; SCHIRMER, J.; BARBIERI, M. [Human Papillomavirus (HPV) and uterine cervical cancer]. *Rev Bras Enferm*, v. 63, n. 2, p. 307-11, 2010 Mar-Apr 2010.
- NANDAN, N. K. *et al.* Allelic variations in 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase gene and susceptibility to cervical cancer in Indian women. *Drug Metab Lett*, v. 2, n. 1, p. 18-22, Jan 2008.
- PANDEY, S. *et al.* Impact of Toll-like receptors [TLR] 2 (-196 to -174 del) and TLR 4 (Asp299Gly, Thr399Ile) in cervical cancer susceptibility in North Indian women. *Gynecol Oncol*, v. 114, n. 3, p. 501-5, Sep 2009.
- PAPANICOLAOU, G. N.; TRAUT, H. F. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. 1941. *Arch Pathol Lab Med*, v. 121, n. 3, p. 211-24, Mar 1997.
- PEDROZA-SAAVEDRA, A. *et al.* The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein synergizes with EGF-receptor signaling to enhance cell cycle progression and the down-regulation of p27(Kip1). *Virology*, v. 400, n. 1, p. 44-52, Apr 2010.
- PETER, M. *et al.* Frequent genomic structural alterations at HPV insertion sites in cervical carcinoma. *J Pathol*, v. 221, n. 3, p. 320-30, Jul 2010.
- PEYTON, C. L. *et al.* Comparison of PCR- and hybrid capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J Clin Microbiol*, v. 36, n. 11, p. 3248-54, Nov 1998.
- PITOL, B. C. V. Análise da expressão das proteínas p16, p53 e L1/HPV nas lesões intraepiteliais cervicais. Ouro Preto: Universidade Federal de Ouro Preto: 126 p. 2012.
- PIYATHILAKE, C. J. *et al.* Protective association of MTHFR polymorphism on cervical intraepithelial neoplasia is modified by riboflavin status. *Nutrition*, v. 23, n. 3, p. 229-35, Mar 2007.
- PIYATHILAKE, C. J. *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism increases the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Anticancer Res*, v. 20, n. 3A, p. 1751-7, 2000 May-Jun 2000.
- POLJAK, M. *et al.* Nucleic acid tests for the detection of alpha human papillomaviruses. *Vaccine*, v. 30 Suppl 5, p. F100-6, Nov 2012.
- PRASAD, V. V.; WILKHOO, H. Association of the functional polymorphism C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with colorectal, thyroid, breast, ovarian, and cervical cancers. *Onkologie*, v. 34, n. 8-9, p. 422-6, 2011.
- QUACH, N.; GOODMAN, M. F.; SHIBATA, D. In vitro mutation artifacts after formalin fixation and error prone translesion synthesis during PCR. *BMC Clin Pathol*, v. 4, n. 1, p. 1, Feb 2004.
- RADY, P. L. *et al.* Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. *Am J Med Genet*, v. 107, n. 2, p. 162-8, Jan 2002.
- RAUBER, D. *et al.* Prognostic significance of the detection of human papilloma virus L1 protein in smears of mild to moderate cervical intraepithelial lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v. 140, n. 2, p. 258-62, Oct 2008.
- REBOLJ, M. *et al.* Disagreement between human papillomavirus assays: an unexpected challenge for the choice of an assay in primary cervical screening. *PLoS One*, v. 9, n. 1, p. e86835, 2014.

- REN, Z. P. *et al.* Recovering DNA and optimizing PCR conditions from microdissected formalin-fixed and paraffin-embedded materials. *Pathobiology*, v. 68, n. 4-5, p. 215-7, 2000.
- RICHART, R. M. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Obstret Gynecol.* 10: 748-784 p. 1967.
- RODRIGUEZ, S.; GAUNT, T. R.; DAY, I. N. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol*, v. 169, n. 4, p. 505-14, Feb 2009.
- SANTOS, A. M. *et al.* Linking TP53 codon 72 and P21 nt590 genotypes to the development of cervical and ovarian cancer. *Eur J Cancer*, v. 42, n. 7, p. 958-63, May 2006.
- SASAGAWA, T.; TAKAGI, H.; MAKINODA, S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. *J Infect Chemother*, v. 18, n. 6, p. 807-15, Dec 2012.
- SAVAS, S.; LIU, G. Genetic variations as cancer prognostic markers: review and update. *Hum Mutat*, v. 30, n. 10, p. 1369-77, Oct 2009.
- SAVAS, S.; LIU, G.; XU, W. Special considerations in prognostic research in cancer involving genetic polymorphisms. *BMC Med*, v. 11, p. 149, 2013.
- SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N. Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 22, n. 4, p. 553-60, Apr 2013.
- SCHLECHT, N. F. *et al.* Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*, v. 95, n. 17, p. 1336-43, Sep 2003.
- SEDJO, R. L. *et al.* Effect of plasma micronutrients on clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection (United States). *Cancer Causes Control*, v. 14, n. 4, p. 319-26, May 2003.
- SELLORS, J. W.; SANKARANARAYANAN, R. *Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Beginners' Manual.* Lyon, France: International Agency for Research on Cancer: 138 p. 2003.
- SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, v. 31, n. 1, p. 27-36, Jan 2010.
- SHEKARI, M. *et al.* Association of genetic polymorphism of the DNA base excision repair gene (APE-1 Asp/148 Glu) and HPV type (16/18) with the risk of cervix cancer in north Indian population. *Cancer Biomark*, v. 4, n. 2, p. 63-71, 2008a.
- SHEKARI, M. *et al.* Impact of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) codon (677) and methionine synthase (MS) codon (2756) on risk of cervical carcinogenesis in North Indian population. *Arch Gynecol Obstet*, v. 278, n. 6, p. 517-24, Dec 2008b.
- SHEN, K. F.; YANG, M.; JIANG, Q. L. [Exploration and analysis of PCR-inhibitory components in peripheral blood and bone marrow samples]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, v. 22, n. 3, p. 842-6, Jun 2014.
- SINGER, A.; MONAGHAN, J. M. *Lower Genital Tract Precancer: Colposcopy, Pathology and Treatment.* Oxford: Blackwell Science: 344 p. 2000.

- SINGH, H. *et al.* Association of TNFA (-308G>A) and IL-10 (-819C>T) promoter polymorphisms with risk of cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*, v. 19, n. 7, p. 1190-4, Oct 2009.
- SOLOMON, D. *et al.* The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*, v. 287, n. 16, p. 2114-9, Apr 2002.
- STANCZUK, G. A. *et al.* Polymorphism at the -308-promoter position of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene and cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*, v. 13, n. 2, p. 148-53, 2003 Mar-Apr 2003.
- STOLER, M. H. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia: implications for diagnostic criteria and testing. *Arch Pathol Lab Med*, v. 127, n. 8, p. 935-9, Aug 2003.
- STOLER, M. H. *et al.* The Interpretive Variability of Cervical Biopsies and Its Relationship to HPV Status. *Am J Surg Pathol*, Jan 2015.
- STOREY, A. *et al.* Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*, v. 393, n. 6682, p. 229-34, May 1998.
- SULL, J. W. *et al.* The effect of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T on cervical cancer in Korean women. *Gynecol Oncol*, v. 95, n. 3, p. 557-63, Dec 2004.
- SUN, T. *et al.* A six-nucleotide insertion-deletion polymorphism in the CASP8 promoter is associated with susceptibility to multiple cancers. *Nat Genet*, v. 39, n. 5, p. 605-13, May 2007.
- SYRJÄNEN, S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. *APMIS*, v. 118, n. 6-7, p. 494-509, Jun 2010.
- SYRJÄNEN, S.; PURANEN, M. Human papillomavirus infections in children: the potential role of maternal transmission. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 11, n. 2, p. 259-74, 2000.
- SZALMÁS, A.; KÓNYA, J. Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*, v. 19, n. 3, p. 144-52, Jun 2009.
- SZÖKE, K. *et al.* IL-10 promoter nt -1082A/G polymorphism and human papillomavirus infection in cytologic abnormalities of the uterine cervix. *J Interferon Cytokine Res*, v. 24, n. 4, p. 245-51, Apr 2004.
- THOMAS, F. *et al.* Detection of the G>C SNP and rare mutations in the 28-bp repeat of TYMS using gel-based capillary electrophoresis. *Pharmacogenomics*, v. 11, n. 12, p. 1751-6, Dec 2010.
- TOMITA, L. Y. *et al.* Polymorphisms in genes involved in folate metabolism modify the association of dietary and circulating folate and vitamin B-6 with cervical neoplasia. *J Nutr*, v. 143, n. 12, p. 2007-14, Dec 2013.
- TONG, S. Y. *et al.* Common polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with risks of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in women with low serum folate and vitamin B12. *Cancer Causes Control*, v. 22, n. 1, p. 63-72, Jan 2011.
- TREMBATH, D. *et al.* Analysis of select folate pathway genes, PAX3, and human T in a Midwestern neural tube defect population. *Teratology*, v. 59, n. 5, p. 331-41, May 1999.
- TRIMBLE, C. L. *et al.* Spontaneous regression of high-grade cervical dysplasia: effects of human papillomavirus type and HLA phenotype. *Clin Cancer Res*, v. 11, n. 13, p. 4717-23, Jul 2005.

- TRIMMER, E. E. Methylenetetrahydrofolate reductase: biochemical characterization and medical significance. *Curr Pharm Des*, v. 19, n. 14, p. 2574-93, 2013.
- UELAND, P. M. *et al.* Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci*, v. 22, n. 4, p. 195-201, Apr 2001.
- UNGUREANU, C. *et al.* Immunocytochemical expression of p16INK4a and HPV L1 capsid proteins as predictive markers of the cervical lesions progression risk. *Rom J Morphol Embryol*, v. 51, n. 3, p. 497-503, 2010.
- VINK, J. M. *et al.* Cervix smear abnormalities: linking pathology data in female twins, their mothers and sisters. *Eur J Hum Genet*, v. 19, n. 1, p. 108-11, Jan 2011.
- VON KEYSERLING, H. *et al.* Analysis of 4 single-nucleotide polymorphisms in relation to cervical dysplasia and cancer development using a high-throughput ligation-detection reaction procedure. *Int J Gynecol Cancer*, v. 21, n. 9, p. 1664-71, Dec 2011.
- WEISBERG, I. *et al.* A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*, v. 64, n. 3, p. 169-72, Jul 1998.
- WRIGHT, T. C. *et al.* Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol*, v. 103, n. 2, p. 304-9, Feb 2004.
- WU, C. Y. *et al.* MTHFR C677T polymorphism was an ethnicity-dependent risk factor for cervical cancer development: evidence based on a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*, Mar 2013.
- XU, X. J.; ZOU, L. W.; WANG, D. B. Cervical cancer with polymorphism in MTHFR C677T gene: a systematic review and meta-analysis. *Mol Biol Rep*, v. 40, n. 1, p. 255-62, Jan 2013.
- YOSHIDA, T. *et al.* Immunochemical analysis of HPV L1 capsid protein and p16 protein in liquid-based cytology samples from uterine cervical lesions. *Cancer*, v. 114, n. 2, p. 83-8, Apr 2008.
- YU, L. *et al.* Association between Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and susceptibility to cervical cancer: a meta-analysis. *PLoS One*, v. 8, n. 2, p. e55835, 2013.
- ZHANG, B. *et al.* The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology*, v. 310, n. 1, p. 100-8, May 2003.
- ZHUO, W. L. *et al.* MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and cervical carcinoma susceptibility: meta-analyses based on 4,421 individuals. *Mol Biol Rep*, v. 39, n. 9, p. 8723-32, Sep 2012.
- ZOODSMA, M. *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and susceptibility for (pre)neoplastic cervical disease. *Hum Genet*, v. 116, n. 4, p. 247-54, Mar 2005.
- ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, v. 2, n. 5, p. 342-50, May 2002.

## 9) ANEXOS

### ANEXO 1A

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(para utilização de amostras histológicas coletadas anteriormente a este projeto)

#### **“ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE CICLO CELULAR E DE PROLIFERAÇÃO NAS LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS”**

Prezada paciente \_\_\_\_\_

Você está sendo convidada a participar de um projeto de pesquisa sobre o câncer de colo uterino e o papilomavírus humano, também chamado de HPV, principal causa destes tumores.

Neste projeto, queremos estudar o material de mulheres que tiveram alterações diferentes no colo uterino (leves a mais graves) para buscar um marcador que possa ser usado para auxiliar no diagnóstico. Sabe-se que a grande maioria das lesões pré-malignas de colo uterino não progredirá para lesões mais acentuadas ou até mesmo para câncer. Entretanto, nos dias de hoje, não está disponível nenhum marcador para estabelecer qual lesão irá progredir e qual não irá progredir. Assim, pode ser que estejam sendo realizados tratamentos desnecessários em lesões que nunca progrediriam para casos mais graves. Entretanto, como o câncer é uma doença de difícil tratamento nos estágios mais avançados, a opção é fazê-lo em qualquer lesão que tenha o risco de progredir.

Você realizou há algum tempo um exame preventivo de câncer de colo uterino (Papanicolaou) que mostrou alterações que levaram o seu médico a solicitar um exame chamado colposcopia. Neste exame, realizado no Centro Viva Vida em Itabirito, o médico analisou o colo uterino com uma lente de aumento. Como você apresentou alteração na colposcopia, foi feita uma biópsia, que é a retirada de uma pequena porção do colo uterino para ser examinada em laboratório através de microscópio (exame histológico). O exame histológico foi realizado no Laboratório Tafuri em Belo Horizonte e forneceu o diagnóstico definitivo das alterações encontradas em seu colo uterino. De posse deste resultado você, provavelmente foi realizado o tratamento. No exame histológico geralmente é analisado apenas uma pequena porção do material obtido nas biópsias. O restante é mantido em arquivo no laboratório, em pequenos blocos feitos de parafina, durante alguns anos e, depois, descartado no lixo hospitalar, pois não tem mais utilidade.

O que estamos solicitando a você é a autorização para utilização dos blocos de parafina da biópsia que você realizou, para ser estudado em nosso projeto de pesquisa. O material que pretendemos utilizar é excedente, ou seja, já foi usado para o seu diagnóstico no passado e agora não possui mais utilidade para você, já que o seu laudo foi emitido, aceito pelo médico e o tratamento já estabelecido. Esclarecemos que o bloco de parafina com a biópsia somente será retirado do Laboratório Tafuri se você nos der autorização, assinando este Termo de Consentimento.

Sua participação nesse projeto é voluntária. Você não terá nenhuma vantagem direta em ceder suas amostras para o projeto porque provavelmente já realizou tratamento para as lesões de colo uterino que possuía. Na verdade, participando do projeto você poderá estar ajudando outras pessoas no futuro para que o tratamento das lesões de colo uterino seja mais melhorado.

Caso o estudo seja interrompido, o bloco de parafina com a biópsia será devolvido ao Laboratório Tafuri.

Os dados serão armazenados em um computador disponibilizado na sala da professora Angélica Alves Lima, coordenadora deste estudo, na Escola de Farmácia da UFOP, localizada à

Rua Costa Sena, 171, Centro, Ouro Preto. A professora Angélica é responsável pela guarda de seu bloco de biópsia e das informações obtidas a partir dele.

Seu nome ou informações que venham a identificar você em nenhum momento serão revelados e garantiremos seu anonimato em publicações científicas que venhamos a realizar.

Você poderá esclarecer qualquer dúvida sobre o projeto com a Prof<sup>a</sup>. Angélica Alves Lima ou com o Prof. Roney Luiz de Carvalho Nicolato, de segunda a sexta-feira, de 8:00 às 11:00 e de 13:00 às 17:00 horas, no LAPAC ou pelo telefone (31) 3559-1646. Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto no Campus Universitário, Morro do Cuzeiro, ICEB II, sala 29, pelos telefones (31)3559-1368 ou (31)3559-1370 ou pelo e-mail propp@ufop.br

Desde já, agradecemos sua colaboração.

Eu, \_\_\_\_\_, após ser esclarecida sobre o projeto de pesquisa, concordo em participar do estudo acima.

---

Assinatura da Paciente

---

Assinatura da Coordenadora

Ouro Preto, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20

**TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
(para utilização de amostras citológicas coletadas anteriormente a este projeto)

*“PREVALÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO E ESTUDO DOS COFATORES  
ENVOLVIDOS NA CARCINOGENESE RELACIONADA AO VÍRUS NA POPULAÇÃO DE OURO  
PRETO, MG”*

Prezada paciente \_\_\_\_\_ .

Você está sendo convidada a participar de um projeto de pesquisa sobre o Papilomavírus Humano, também chamado de HPV, principal causa do câncer de colo uterino. Esse projeto será realizado no município de Ouro Preto e seus distritos e iniciará em Julho de 2008 com término previsto para setembro de 2009.

Com este estudo saberemos a porcentagem de mulheres que apresentam o HPV e os fatores relacionados ao desenvolvimento do câncer do colo do útero na população de Ouro Preto, um Programa de Estudo e Aconselhamento a respeito do HPV, voltado às mulheres do município.

Se você quiser participar, deverá responder um questionário e realizar um exame ginecológico no qual será coletada uma amostra de material do colo do útero para teste citológico e molecular. A coleta será realizada por profissional habilitado e com a solicitação de seu médico. Além disso, serão coletadas amostras de sangue para a pesquisa da presença do vírus, para a realização de hemograma, dosagem de folato e vitamina B12 e para análise de alguns compostos químicos causadores do câncer. Este material será dividido em pequenas quantidades e armazenado no Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC) – Rua Costa Sena, 171, Centro, 35.400-000 – Ouro Preto – MG e deverá ser utilizado exclusivamente para as finalidades acima.

Os procedimentos utilizados apresentam risco habitual, visto serem de rotina do clínico e do laboratório. Para diminuir os riscos, todo o material utilizado será descartável, seguindo as normas de biossegurança estabelecidas pelo laboratório.

Sua participação nesse projeto é voluntária. Você pode abandonar o estudo em qualquer momento sem que isto lhe cause prejuízo, inclusive no seu acompanhamento. Todos os exames e consultas médicas serão gratuitos e realizados no LAPAC da UFOP, no Instituto Butantan em São Paulo, nos postos de saúde da UFOP e da prefeitura municipal de Ouro Preto, seguindo rigorosamente os critérios estabelecidos.

Todos os dados obtidos serão mantidos em sigilo, cabendo apenas a você e ao médico responsável, o conhecimento deles. Você poderá esclarecer qualquer dúvida com a Prof.<sup>a</sup> Angélica Alves Lima ou como Prof. Roney Luiz de Carvalho Nicolato, de segunda a sexta-feira, de 8:00 às 11:00 e de 13:00 às 17:00 horas, no LAPAC ou pelo telefone (31) 3559-1646.

Desde já, agradecemos sua colaboração.

Eu, \_\_\_\_\_ ,  
após ser esclarecida sobre o projeto de pesquisa, concordo em participar do estudo acima.

\_\_\_\_\_  
Assinatura da Paciente

\_\_\_\_\_  
Assinatura da Coordenadora

Ouro Preto, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_\_



**ANEXO 1B**

Belo Horizonte, 28 de abril de 2011.

Ilma. Profa. Dra.  
Olívia Maria de Paula Alves Bezerra  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa / UFOP

Prezada Coordenadora,

Autorizo a retirada de blocos de biópsias de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical/carcinoma, armazenados no Laboratório Tafuri, para completar a amostragem do Projeto de Pesquisa intitulado "Análise da Expressão de Proteínas de Ciclo Celular e de Proliferação nas Lesões Intraepiteliais Cervicais", coordenado pela Professora Dra. Angélica Alves Lima, do Departamento de Análises Clínicas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

Esclareço que, como colaborador, estou ciente da necessidade e importância da análise da amostragem definida no projeto.



Dr. Alexandre Tafuri  
Médico Anátomo-Patologista

Sócio-Proprietário do Laboratório Tafuri de Patologia LTDA

Exames de prevenção - Citologias - Biópsias - Imuno-histoquímica  
Rua São Paulo, 893 - Conj. 1009 - 30170-131 - Centro - Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil

(31) 3273-2503  
www.laboratoriotafuri.com.br



LABORATÓRIO TAFURI DE PATOLOGIA

ANEXO 2



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro  
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil  
Fone: (31) 3559-1365 Fax: (31) 3559-1370



OFÍCIO CEP Nº. 015/2013, de 1 de fevereiro de 2013.

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Angélica Alves Lima

DEACL/ENUT/UFOP

Senhora Pesquisadora,

É com prazer que comunicamos a **Aprovação**, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto, do adendo ao seu projeto intitulado "Análise da expressão de proteínas de ciclo celular e de proliferação nas lesões intraepiteliais cervicais." (CAAE: 0022.0.238.000-10), que solicita autorização para inclusão de avaliação de marcadores bioquímicos, inflamatórios, genéticos e de matriz tecidual no material que já está em análise. Em relação a alteração do título do projeto de pesquisa, o mesmo foi cadastrado no SISNEP com o título anterior, portanto para alterar o mesmo, deverá ser realizado novo cadastro na Plataforma Brasil, pois o CAAE está diretamente ligado ao título do projeto.

Atenciosamente,

Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
Universidade Federal de Ouro Preto

### ANEXO 3

#### **Protocolo de extração de DNA de amostras histológicas: QIAamp® DNA FFPE Tissue (QIAGEN)**

1. Adicionar 180µl do tampão ATL e 20µl de proteinase K
2. Homogeneizar (vortex)
3. Incubar a 56°C durante a noite
4. Incubar a 90°C por 1 hora (só colocar a amostra no termobloco depois que este tiver atingido a temperatura de 90°C)
5. Centrifugar rapidamente apenas para remover algum resíduo de amostra que esteja na tampa do microtubo
6. Adicionar 200µl do Tampão AL
7. Homogeneizar (vortex)
8. Adicionar 200µl de etanol (96-100%)
9. Homogeneizar (vortex)
10. Centrifugar rapidamente apenas para remover algum resíduo de amostra que esteja na tampa do microtubo
11. Transferir a amostra pra uma coluna
12. Centrifugar a 8000rpm por 1min
13. Trocar a coluna para um novo tubo coletor de 2ml
14. Adicionar 500µl do tampão AW1
15. Centrifugar a 8000rpm por 1min
16. Trocar a coluna para um novo tubo coletor de 2ml
17. Adicionar 500µl do tampão AW2
18. Centrifugar a 8000rpm por 1min
19. Trocar a coluna para um novo tubo coletor de 2ml
20. Centrifugar a 14000rpm por 3min
21. Transferir a coluna para um microtubo de 1,5ml
22. Adicionar 100µl do tampão ATE
23. Aguardar 1 minuto
24. Centrifugar a 14000rpm por 1min
25. Descartar a coluna
26. Armazenar a solução de DNA no microtubo a uma temperatura de -80°C

## ANEXO 4

### Protocolo de extração de DNA de amostras citológicas: illustra blood genomicPrep Mini Spin® (GE Healthcare)

#### 1ª Etapa:

- Adicionar em um microtubo:
  - 20µl de Proteinase K
  - 400µl de Tampão de lise (frasco de tampa vermelha)
  - 200µl da amostra, após esta ter sido homogeneizada
- Homogeneizar (Vortex)
- Aguardar 10 minutos

#### 2ª Etapa

- Transferir a amostra para uma coluna
- Centrifugar a 9000 rpm por 1 minuto
- Descartar o que foi depositado no tubo coletor

#### 3ª Etapa

- Adicionar 500µl de Tampão de Lise (frasco de tampa vermelha)
- Centrifugar a 9000 rpm por 1 minuto
- Descartar o que foi depositado no tubo coletor

#### 4ª Etapa

- Adicionar 500µl de Tampão de Lavagem (frasco de tampa amarela)
- Centrifugar a 9000 rpm por 3 minutos

#### 5ª Etapa

- Transferir a coluna para um novo microtubo
- Adicionar 95µl de Tampão de Eluição pré-aquecido a 70°C (frasco de tampa cinza)
- Aguardar 1 minuto
- Centrifugar a 9000 rpm por 1 minuto
- Descartar a coluna e armazenar o material do microtubo a uma temperatura de -80°C

## ANEXO 5

## Protocolo para coloração do gel de poliacrilamida com nitrato de prata

<b>Solução (tempo)*</b>	<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
<b>Fixadora (15 minutos)</b>	Etanol P.A.	5 ml
	Ácido acético glacial	250 µl
	Água destilada	45 ml
<b>Nitrato de prata (10 minutos)</b>	Nitrato de prata	0,15 g
	Água destilada	50 ml
<b>Reveladora (**)</b>	Hidróxido de sódio	1,5 g
	Formaldeído	150 µl
	Água destilada	qsp 50 ml

\*Sob agitação;

\*\*Até o aparecimento das bandas no gel;

## ANEXO 6

**Protocolo de PCR para genotipagem da MTHFR nas amostras citológicas: concentração dos reagentes**

Reagentes	MTHFR
PCR Master Mix <sup>®1</sup>	12,5µl
Iniciadores (10 pmol/µl)	0,25 µl
DNA	20ng
Água <sup>2</sup>	qsp 25µl

<sup>1</sup>Promega: 0,2mM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> e 1,0 unidade de Taq DNA de 25µl

<sup>2</sup>*Nuclease Free-water*

**Protocolo de PCR para genotipagem da MTHFR nas amostras citológicas no Termociclador NyxTechnik**

Gene amplificado	Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo	Reação
MTHFR	1	94	1'	Desnaturação
	35	94	1'	Desnaturação
		59	30"	Anelamento
		72	30"	Extensão
	1	72	5'	Extensão final

## ANEXO 7

**Conceitos e cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) dos testes para pesquisa de HPV.****Observações:**

- a) O diagnóstico histopatológico foi considerado como padrão-ouro;
- b) Na imuno-histoquímica: teste negativo (marcação <25%:) e teste positivo (marcação ≥25%);
- c) VP: verdadeiros positivos; VN: verdadeiros negativos; FP: falsos positivos; FN: falsos negativos.

**1) Sensibilidade (s):** é a probabilidade de um indivíduo avaliado e doente de ter seu teste alterado (positivo). Número de indivíduos doentes e com teste positivo/número total de indivíduos doentes;

$$s = \frac{VP}{VP+FN}$$

**2) Especificidade (e):** é a probabilidade de um indivíduo avaliado e normal ter seu teste normal (negativo). Número de indivíduos normais e com teste negativo/número total de indivíduos normais;

$$e = \frac{VN}{VN+FP}$$

**3) Valor preditivo positivo (VPP):** é a probabilidade de um indivíduo avaliado e com resultado positivo ser realmente doente.

$$VPP = \frac{VP}{VP+FP}$$

**4) Valor preditivo negativo (VPN):** é a probabilidade de um indivíduo avaliado e com resultado negativo ser realmente normal.

$$VPN = \frac{VN}{VN+FN}$$

## ANEXO 8

## Frequência dos genótipos da MTHFR de acordo com o país/etnia, metodologia e n amostral:

TABELA 1: População americana.

Estudo	País	Metodologia	n amostral	Genótipo da MTHFR (%: CC/CT/TT)	Associação com o câncer cervical
Badiga <i>et al.</i> , 2014	Estados Unidos	PCR/RFLP analisado em gel de agarose 3%	455	70,8/25,7/3,5	Não associado
Piyathilake <i>et al.</i> , 2007	Estados Unidos	PCR/RFLP analisado em gel de agarose 1,8%	435	65/30/5	Fator de proteção
Henao <i>et al.</i> , 2005	Estados Unidos	PCR/RFLP analisado em gel de agarose 1,8%	436	65/30/5	Fator de proteção
Piyathilake <i>et al.</i> , 2000	Estados Unidos	NI*	95	35/50/15	Fator de risco
Goodman <i>et al.</i> , 2001	Estados Unidos	PCR/RFLP analisado em gel de poliacrilamida	329	51/43/6	Fator de risco
Tomita <i>et al.</i> , 2013	Brasil	PCR em tempo real	947	49,5/44/6,5	Fator de risco
Delgado-Enciso <i>et al.</i> , 2006	México	PCR/RFLP analisado em gel de agarose 3%	159	24/52/24	Não associado
Silva, 2015	Brasil	PCR/RFLP analisado por eletroforese capilar	240	64/31/5	Fator de proteção

\*Não informado pelo autor



**TABELA 2:** População Europeia.

Estudo	País	Metodologia	n amostral	Genótipo da MTHFR (%: CC/CT/TT)	Associação com o câncer cervical
Botezatu <i>et al.</i> , 2013	Romênia	PCR/RFLP analisado em gel de agarose 3%	150	50/43/7	Fator de risco
Von Keyserling <i>et al.</i> , 2011	Alemanha	PCR multiplex	714	46/45/8	Fator de risco
Zoodma <i>et al.</i> , 2005	Holanda	PCR em tempo real	1492	50/41/8	Fator de risco
Mostowska <i>et al.</i> , 2011	Polônia	PCR/RFLP analisado em gel de agarose 2%	292	43/48/9	Não associado
Lambropoulos <i>et al.</i> , 2003	Grécia	PCR/RFLP analisado em gel de agarose 4%	229	44/45/11	Não associado

**TABELA 3:** População Asiática.

Estudo	País	Metodologia	n amostral	Genótipo da MTHFR (%: CC/CT/TT)	Associação com o câncer cervical
Prasad e Wilkhoo, 2011	India	PCR/RFLP	187	92,5/6,9/0,6	Não associado
Kohaar <i>et al.</i> , 2010	India	PCR em tempo real	434	70/28/2	Não associado
Shekari <i>et al.</i> , 2008b	India	PCR/RFLP analisado em gel de agarose 4%	400	74/24/2	Fator de proteção
Nandan <i>et al.</i> , 2008)	India	PCR/RFLP analisado em gel de poliacrilamida 10%	139	64/36 (CT+TT)	Fator de risco
Tong <i>et al.</i> , 2011	Coreia do Sul	PCR em tempo real	892	35/47/18	Fator de risco
Sull <i>et al.</i> , 2004	Coreia do Sul	PCR em tempo real	916	31/49/20	Fator de risco
Kang <i>et al.</i> , 2005	Coreia do Sul	PCR/RFLP analisado em gel de agarose 3%	153	37/42/21	Não associado