



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

KELLY DEYSE SEGATI

**Análise da metilação dos genes *SOX17*, *DKK3* e *SFRP2*,
tipos de HPV e associação com a origem e o estadiamento
do câncer de colo uterino.**

**Goiânia
2017**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

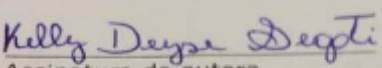
Nome completo do autor: Kelly Deyse Segati.

Título do trabalho: Análise da metilação dos genes *SOX17*, *DKK3* e *SFRP2*, tipos de HPV e associação com a origem e o estadiamento do câncer de colo uterino.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

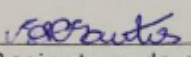
Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura da autora

Data: 18/09/2017

Ciente e de acordo:



Assinatura da orientadora

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

Versão atualizada em maio de 2017.

KELLY DEYSE SEGATI

**Análise da metilação dos genes *SOX17*, *DKK3* e *SFRP2*,
tipos de HPV e associação com a origem e o estadiamento
do câncer de colo uterino.**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Tropical e Saúde Pública da Universidade
Federal de Goiás para obtenção do
Título de Doutor em Medicina Tropical e
Saúde Pública.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Helena
Rabelo dos Santos.

**Goiânia
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Segati, Kelly Deyse

Análise da metilação dos genes SOX17, DKK3 e SFRP2, tipos de HPV e associação com a origem e o estadiamento do câncer de colo uterino. [manuscrito] / Kelly Deyse Segati. - 2017.

C, 100 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Sílvia Helena Rabelo dos Santos; co orientadora Dra. Vera Aparecida Saddi.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Câncer de colo uterino . 2. Papilomavírus humano. 3. Metilação . 4. Via Wnt. I. Rabelo dos Santos, Sílvia Helena , orient. II. Título.

CDU 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Rua 235, s/n - Setor Universitário - Goiânia/GO - CEP: 74.605-080
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 - Fax: (62) 3209.6363 - e-mail: ppgmtp.ufg@gmail.com

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE KELLY DEYSE SEGATI - Aos oito dias do mês de agosto do ano de 2017 (08/08/2017), às 14:30 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. SILVIA HELENA RABELO DOS SANTOS, HENRIQUE MOURA DE PAULA, LAURA CRISTINA SICHERO VETTORAZZO, MARA RUBIA NUNES CELES e SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: "ANÁLISE DA METILAÇÃO DOS GENES SOX17, DKK3 E SFRP2, TIPOS DE HPV E ASSOCIAÇÃO COM A ORIGEM E O ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE COLO UTERINO" em nível de DOUTORADO, área de concentração em PATOLOGIA, de autoria de KELLY DEYSE SEGATI discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora Profa. Dra. SILVIA HELENA RABELO DOS SANTOS, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1034/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando a candidata **Aprovada ou Reprovada**:

Banca Examinadora

Dra. Silvia Helena Rabelo dos Santos
Dr. Henrique Moura de Paula
Dra. Laura Cristina Sichero Vettorazzo
Dra. Mara Rubia Nunes Celes
Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain

Aprovada / Reprovada

Aprovada
Aprovada
Aprovada
APROVADA
Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **habilitada** (Habilitada ou não Habilitada), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de DOUTOR EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, na área de concentração em PATOLOGIA, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 18h30min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor. A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Dra. Silvia Helena Rabelo dos Santos (FF/UFG)

Dr. Henrique Moura de Paula (ACCG/GO)

Dra. Laura Cristina Sichero Vettorazzo (USP/SP)

Dra. Mara Rubia Nunes Celes (IPTSP/UFG)

Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain (UNICAMP/SP)

Secretário da Pós-Graduação:

Kariny V. Soares

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: Kelly Deyse Segati

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Rabelo dos Santos

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida Saddi

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Rabelo dos Santos

2. Prof^a. Dr^a. Mara Rúbia Nunes Celes

3. Dr. Henrique Moura de Paula

4. Dr^a. Sophie Françoise Mauricette Derchain

5. Dr^a. Laura Cristina Sichero Vettorazzo

Data: 08/08/2017

"Dedico este trabalho aos meus pais, Ethel e Lino Segati"

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever essa tese foi utilizar apenas uma página para agradecer as pessoas que acompanharam minha trajetória de seis anos na Universidade Federal de Goiás.

Início os agradecimentos por meus pais que sempre primaram por minha educação. O Sr. Lino Segati e a Sr.^a Professora Esp. Ethel Avelino Segati, moldes de caráter e humildade.

Agradeço à minhas tias Quitéria, Ana, Núbia, Zuleica e Lucimar pelo exemplo feminino de força, determinação e garra em busca dos objetivos. Ao meu tio Pedro Nóbrega pelo exemplo de calma e sabedoria. A todos eles agradeço pela brilhante trajetória no magistério, trajetória esta que me inspirou a seguir os vossos passos.

Agradeço aos amigos de caminhada Mayra, Fernanda, Laurenzo, Maria Edilma, Narriman, Emerith e Helayne; aos familiares, Ana Carolina, Helga, Roberto, Cleverson, Daiane e Paula, a todos os queridos primos que acompanharam atentamente cada passo dado, alegrando-se nas vitórias e compartilhando as frustrações nos momentos difíceis.

Agradeço a Universidade Federal de Goiás e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública por me proporcionar a conquista do conhecimento.

Esta tese foi realizada com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ – Brasil, agradeço essa instituição pelo apoio financeiro e interesse na pesquisa. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás por financiar os testes de detecção e genotipagem de HPV. Agradeço a equipe do Laboratório Rômulo Rocha, onde aperfeiçoei meus conhecimentos como Farmacêutica citopatologista.

Agradeço à toda equipe do Hospital Araújo Jorge especialmente ao Departamento de Anatomia Patológica, Departamento de Ginecologia e Mama e ao Setor de Arquivo Médico pela colaboração para a realização da tese.

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Rabelo dos Santos e coorientadora Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida Saddi não apenas pela didática impecável em sala de aula, mas também pela confiança empregada a mim e pela seriedade com que tratam suas pesquisas na área de câncer.

SUMÁRIO

1.0. Introdução	1
1.1. Câncer de colo uterino	1
1.1.1. Papilomavírus humano (HPV)	1
1.1.2. Progressão do câncer de colo uterino	3
1.1.3. Tipos histológicos de câncer de colo uterino	4
1.1.4. Estadiamento do câncer do colo uterino	5
1.1.5. Prognóstico das pacientes com câncer de colo uterino	7
1.1.6. Eventos epigenéticos envolvidos no câncer de colo uterino	7
1.1.7. Metilação do DNA	8
1.2. Via de sinalização <i>int/wingless</i> (Wnt)	9
1.2.1. Inibidores da via de sinalização Wnt	11
2.0. Justificativa	14
3.0. Objetivos	15
3.1. Objetivo geral	15
3.2. Objetivos específicos	15
4.0. Métodos	16
4.1. Desenho do estudo	16
4.2. Tamanho amostral	16
4.3. Seleção de sujeitos	16
4.3.1. Critérios de inclusão	16
4.3.2. Critérios de exclusão	16
4.3.3 Fluxograma de distribuição dos casos	17
4.4. Técnicas, testes e exames	18
4.4.1. Diagnóstico histológico	18
4.4.2. Análise molecular	18
4.4.2.1. Extração e avaliação do DNA presente na amostra	18
4.4.2.2. Detecção e genotipagem de HPV	19
4.4.2.3. Tratamento do DNA com bissulfito de sódio.	19
4.4.2.4. Análise do perfil de metilação através de M-PCR	20
4.5. Coleta de dados	21
4.6. Processamento e análise dos dados	21
4.6.1. Variáveis dependentes	21
4.6.2. Variáveis independentes	21
4.7 Aspectos éticos	22
5.0 Artigos	23
6.0 Discussão	73
7.0. Conclusões	75
8.0. Referências	76
9.0. Anexos	81

QUADROS E FIGURAS

Quadro 1 - Tipos histológicos de câncer de colo uterino	4
Quadro 2 - Estadiamento do câncer de colo uterino	6
Figura 1 - Via de sinalização Wnt canónica	10
Quadro 3 - Principais características dos genes inibidores da via de sinalização Wnt	13
Figura 2 - Fluxograma de casos	17
Quadro 4 - Conformação do DNA prévia e seguida ao tratamento com bissulfito de sódio	20
Quadro 5 - Sequências de iniciadores utilizados na M-PCR	21

SIGLAS E ABREVIATURAS

5-Mec	Do inglês <i>5-Methylcytosine</i>
APC	Do inglês <i>Adenomatous polyposis coli</i>
BD	Do inglês <i>desulfonation buffer</i>
BL	Do inglês <i>ligation buffer</i>
BW	Do inglês <i>wash buffer</i>
C	Citosina
CH3	Radical metil
CKI α	Do inglês <i>Casein Kinase 1α</i>
C-myc	Do inglês <i>The cell myelocytomatosis</i>
CpG	Citosina ligação fosfodiéster Guanina
D1	Do inglês <i>Cyclin D1</i>
DKK	Do inglês <i>Dickkopf</i>
DNA	Do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNMT	DNA metiltransferase
DNTP	Do inglês <i>deoxynucleotide</i>
FDA	Do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FIGO	Do inglês <i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i>
Fz	Do inglês <i>Frizzled</i>
G	Guanina
HPV	Do inglês <i>Human papillomavirus</i>
IARC	Do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICTV	Do inglês <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IUCC	Do inglês <i>Union for International Cancer Control</i>
LEF1	Do inglês <i>Lymphoid enhancer-binding factor</i>
LRP	Do inglês <i>receptor-related protein</i>
M-PCR	Do inglês <i>methylation specific PCR</i>
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
RNA	Do inglês <i>ribonucleic acid</i>
SFRP	Do inglês <i>Secreted frizzled-related protein</i>

SOX	Do inglês <i>Sex determining region Y</i>
TCF	Do inglês <i>T-cell factor</i>
Wnt	Do inglês <i>int/Wingless</i>

RESUMO

O câncer de colo uterino é causado pela infecção persistente por HPV de alto risco oncogênico. Em adição, as alterações genéticas e epigenéticas como o silenciamento dos genes inibidores da via de sinalização Wnt parecem ser essenciais para o desenvolvimento e progressão da doença. Esse estudo teve como objetivo analisar a prevalência de infecções por genótipos específicos de HPV em câncer de colo uterino e verificar as associações entre a idade, tipo histológico, o grau de diferenciação tumoral e a presença da metilação na região promotora dos genes *DKK3*, *SOX17* e *SFRP2*. Trata-se de um estudo de corte transversal incluindo 106 casos de câncer de colo uterino, distribuídos em diagnósticos de carcinomas de células escamosas e adenocarcinomas. As amostras foram testadas para 25 genótipos de HPV utilizando o kit INNOLipa®, em seguida foram submetidas a M-PCR para identificar a presença da metilação na região promotora dos genes *DKK3*, *SOX17* e *SFRP2*. Os resultados da pesquisa mostraram que a idade foi significativamente menor em mulheres com adenocarcinomas cervicais comparadas com aquelas com diagnóstico de carcinoma de células escamosas. A infecção por genótipos 18 e 45 foram significativamente associadas ao diagnóstico de adenocarcinomas em mulheres com idade menor que 50 anos. A metilação dos inibidores da via de sinalização Wnt e as infecções por HPV 16, 18 e 45 são eventos frequentes durante a carcinogêneses em várias etapas, no entanto, apenas foi observada associação significativa com a metilação de *SFRP2*. A metilação de *SOX17* foi relacionada com menor gravidade do câncer de colo uterino, mas não com tipos de HPV. Os adenocarcinomas apresentaram associação significativa com infecções por HPV 16, 18 e 45, além de demonstrar uma associação limítrofe com a metilação de *DKK3* e *SOX17*. Concluindo os resultados do presente estudo contribuem para o melhor entendimento da carcinogêneses do colo uterino na região Centro-Oeste do Brasil.

ABSTRACT

Cervical cancer is caused by persistent high-risk HPV infection. In addition, genetic and epigenetic changes such as the silencing of Wnt signaling pathway inhibitor genes appear to be essential for the development and progression of the disease. This study aimed to analyze the prevalence of HPV infections in cervical cancer and to verify the associations between age, histological type, degree of tumor differentiation and the presence of methylation *DKK3*, *SOX17* and *SFRP2*. This is a cross-sectional study including cases of cervical cancer, distributed in diagnoses of squamous cell carcinomas and adenocarcinomas. The samples were assayed for 25 HPV genotypes using the INNOLipa® kit, then performed M-PCR to identify the presence of methylation in the promoter region of the genes *DKK3*, *SOX17* and *SFRP2*. The results of the research showed that the age is significantly lower for women with cervical adenocarcinomas compared to those with a diagnosis of squamous cell carcinoma. Infections with genotypes 18 and 45 were associated with the diagnosis of adenocarcinomas in women younger than 50 years. Methylation of inhibitors of the Wnt signaling pathway and HPV infections 16, 18 and 45 are frequent events during multistage carcinogenesis, however, only a significant association with *SFRP2* methylation was observed. The methylation of *SOX17* was related to lower cervical cancer severity but not to HPV types. Adenocarcinomas were significantly associated with HPV infections 16, 18 and 45, and demonstrated a borderline association with *DKK3* and *SOX17* methylation. In summary, the results of the present study contribute to a better understanding of carcinogenesis of the cervix in the Center-West of Brazil.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Câncer do colo uterino

O câncer de colo uterino é a quarta causa de óbitos em mulheres em todo o mundo, representando 9% do total de novos casos de cânceres e 8% no total das mortes por câncer entre as mulheres, configurando-se como um importante problema de saúde pública. Em 2012, foram diagnosticados 528.000 novos casos de câncer de colo uterino e 266.000 mulheres morreram devido a doença, a maioria dos casos de mortes ocorreram em países de baixa e média renda (GLOBOCAN, 2012; FERLAY et al., 2015).

O câncer de colo uterino se desenvolve a partir de lesões precursoras, as quais têm potencialidade para progressão se não são detectadas e tratadas precocemente. O alto índice nos países em desenvolvimento e em outros lugares, entre populações carentes é em grande parte devido à deficiência nos programas de rastreio, que permite a detecção de lesões pré-cancerosas e câncer em estágio inicial. A infraestrutura de atendimento nesses países não mantém um padrão uniforme dos testes de rastreio (PASSAMONTI et al., 2016; DENNY ET AL., 2017).

Os continentes apresentam taxas de incidências variadas. As menores taxas ocorrem em locais de alta renda como na Europa (11,4/100.000 casos) e Ásia (12,7/100.000 casos), em locais de média e baixa renda ocorrem grande disparidade como no continente africano onde as taxas variam de 6,6 à 42,7 casos por 100.000 mulheres. Nas Américas a média geral de incidência é 14,9 variando de 6,6 a 23,5 casos por 100.000 mulheres, ao longo dos anos nesses locais as taxas subiram ou se mantiveram inalteradas (FERLAY et al., 2015). As taxas de incidências na América Latina variam de 9 a 40 casos por 100.000 mulheres, entre as brasileiras as taxas de incidências variam de 9 à 15,9 /100.000 casos (WHO, 2014).

1.1.1. Papilomavírus humano (HPV)

O Papilomavírus apresenta elevada variabilidade genética. BRAVO & FÉLES-SÁNCHEZ (2015), apresentaram uma expansão da classificação da família *Papillomaviridae* contendo 29 gêneros que agrupam mais de 200 tipos de Papilomavírus, sendo 60 tipos da família *alphapapillomavirus*. Entre a família *alpha* estão todos os HPVs oncogênicos associados aos cânceres anogenitais. A classificação deste grupo de vírus, que incluem importantes patógenos humanos, tem sido debatida há décadas (de VILLIERS et al., 2004; BERNARD et al., 2010; BRAVO & FÉLES- SÁNCHEZ, 2015).

O HPV tem capacidade de infectar o trato anal, pele, cavidade nasal e orofaríngea, cerca de 40 tipos de HPV infectam o trato genital feminino. A infecção está limitada aos

queratinócitos indiferenciados na camada basal do epitélio escamosos estratificado, sendo necessário para o seu ciclo de vida a diferenciação celular (BRAVO & FELES-SANCHEZ, 2015).

Os genótipos de HPV que infectam a mucosa são divididos em subgrupos. A classificação da carcinogenicidade utilizada pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) designa os vírus entre alto e baixo risco oncogênico, de acordo com a propensão das células infectadas progredirem à malignidade. Os genótipos de HPV 16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 foram classificados como carcinogênicos para humanos, o HPV 68 foi classificado como provavelmente carcinogênico. Entre o grupo classificado como possivelmente carcinogênico estão os genótipos 5, 8, 26, 53, 66, 67, 70, 73, 82, 30, 34, 69 85 e 97. Os genótipos de HPV considerados sem evidências de carcinogenicidade em humanos, foram HPV 6 e 11 frequentemente associados à condilomas acuminados (IARC, 2012).

Entre os genótipos de HPV reconhecidos como oncogênicos pela IARC, os mais prevalentes são HPV 16 e o 18, responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer de colo uterino. A prevalência de um genótipo particular e sua associação com o câncer de colo uterino varia com a região geográfica (IARC, 2012).

Os genótipos de HPV 16 e 18 são predominantes nos carcinomas de células escamosas e adenocarcinomas, seguidos pelo genótipo 45. A associação com os genótipos 59, 35, 33, 31, 58 e 51 é bem menos frequente (SCHIFFMAN et al., 2015; HAMMER et al., 2016). É importante observar que existe uma diferença na distribuição de genótipos oncogênicos em carcinoma de células escamosas e adenocarcinomas cervicais. Estudos indicam que o HPV16 é o mais prevalente em carcinomas escamosos, sendo observado em 50% a 60% dos casos, enquanto o genótipo HPV18 ocorre em 10% a 20%. Em contraste, o genótipo HPV18 é observado em 40% a 60% dos casos de adenocarcinomas, enquanto o tipo 16 ocorre em 40% a 60%. Os tipos 45 e 31 contribuem para os 7 a 9% restantes dos adenocarcinomas (JEMAL et al., 2011; NICOLÁS-PÁRRAGA et al., 2017).

1.1.2. Progressão do câncer de colo uterino

O principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões precursoras e câncer do colo uterino é a infecção por genótipos de alto risco oncogênico de HPV. Contudo, essa infecção, por si só, não representa uma causa suficiente para o surgimento da neoplasia, faz-se necessário sua persistência (IARC, 2012).

A persistência da infecção por HPV de alto risco oncogênico é considerada o fator determinante na progressão de lesões precursoras para o carcinoma invasor (TOTA et al.,

2017). Nesses casos, a presença contínua do genoma viral no interior da célula hospedeira pode interferir no controle do ciclo celular, permitindo a replicação do DNA mesmo em situações onde o mesmo encontra-se danificado (BRAVO & FELES- SANCHEZ, 2015). A integração do genoma do HPV de alto risco ao genoma do hospedeiro pode representar um evento significativo na patogênese do câncer de colo uterino associado à progressão de lesões pré-neoplásicas para câncer invasivo (HAMMER et al., 2016). A história natural da doença apresenta várias oportunidades de intervenções preventivas no desenvolvimento do câncer de colo uterino (TOTA et al., 2017).

Alguns fatores secundários parecem influenciar na persistência da infecção e aumentar o risco de progressão para neoplasia cervical, como o tabagismo, paridade, o uso de contraceptivos orais e outras infecções sexualmente transmissíveis (WHO, 2014). Alterações genéticas e epigenéticas como a metilação no genoma viral e do hospedeiro podem estar associadas à progressão da doença (BHAT et al., 2016).

A idade também interfere nesse processo, a maioria das infecções por HPV em mulheres com menos de 30 anos regride espontaneamente, ao passo que, acima dessa idade, a persistência é mais frequente. Outros fatores de risco acrescidos a infecção por HPV estão relacionados ao câncer de colo uterino, como por exemplo: o início da atividade sexual em idade jovem, maior número de parceiros sexuais ao longo da vida, alta paridade, uso de contraceptivos orais e tabagismo ativo e passivo, casos de imunossupressão como por exemplo, a coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana pode levar à persistência de infecções virais a longo prazo (IARC, 2012; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Como resultado, estes fatores em conjunto, podem alterar o controle do ciclo celular, fazendo com que a célula hospedeira adquira um fenótipo imortal e, finalmente progrida em direção a um fenótipo maligno (VASILJEVIC et al., 2014).

1.1.3. Tipos histológicos de câncer do colo uterino

Os tipos histológicos de carcinoma de colo uterino estão listados no quadro 1. A variedade de tipos histológicos possíveis nessa topografia, seus diferentes comportamentos clínicos e tratamentos tornam imprescindível a biópsia para a confirmação do tipo histológico, com a finalidade de planejar adequadamente o tratamento dessas pacientes (KURMAN et al., 2014).

Quadro 1- Tipos histológicos de câncer de colo uterino

PRINCIPAIS TIPOS HISTOLÓGICOS DE CANCER DE COLO UTERINO	
NEOPLASIAS EPITELIAIS:	OUTRAS NEOPLASIAS EPITELIAIS:
Carcinoma de células escamosas: 85-90% Ceratinizante Não ceratinizante Basalóide Verrucoso Warty Papilar Linfoepitelioma-like Transicional Adenocarcinoma: 10-15% Adenocarcinoma mucinoso – Endocervical – Intestinal – Células em anel de sinete – Desvio mínimo – Viloglandular Adenocarcinoma endométrioide Adenocarcinoma de células claras Adenocarcinoma seroso Adenocarcinoma mesonéfrico	Carcinoma adenoescamoso – Variante “glassy cell” Carcinoma adenoide cístico Carcinoma adenoide basal Carcinoma indiferenciado
	NEOPLASIAS MESENQUIMAIS:
	Leiomiossarcoma Sarcoma botrióide Sarcoma alveolar de partes moles
	TUMORES MISTOS EPITELIAIS E MESENQUIMAIS:
	Carcinosarcoma (tumor mulleriano misto maligno) Adenosarcoma
	MELANOMA
	LINFOMAS

Fonte: OMS, (2012).

O tipo histológico mais comum do câncer de colo uterino é o carcinoma de células escamosas, representando cerca de 85% a 90% dos casos. Os adenocarcinomas ocorrem entre 10% a 20% dos casos e carcinomas adenoescamosos são detectados em cerca de 2% a 3% dos casos. Embora seja menos frequente que o carcinoma escamoso, a incidência do adenocarcinoma vem aumentando no decorrer dos anos (CASTELLSANGUE et al., 2006; SCHIFFIMAN et al., 2007; YOKOI et al., 2017). O carcinoma adenoescamoso exibe diferenciação glandular e escamosa e pode apresentar pior prognóstico do que os carcinomas de células escamosas ou adenocarcinomas (YOKOI et al., 2017).

Os fatores patológicos incluindo o tamanho tumoral, presença de metástase linfonodal, invasão vascular, a profundidade da invasão estromal e a extensão de paramétrio e órgãos adjacentes são fatores implicados no prognóstico da paciente com câncer de colo uterino. O grau de diferenciação como fator prognóstico independente é controverso, principalmente pela falta de padronização e alta subjetividade evidenciada

pela fraca concordância intra e interobservador. Contudo, há indicações de que um menor grau de diferenciação histológica possua pior prognóstico (ZANG et al., 2016).

Há alguma evidência de que HPV 18 esteja mais relacionado a neoplasias indiferenciadas (SILVA-FILHO, 2009). Segundo estudos, neoplasias com menor grau de diferenciação costumam mostrar maior taxa de progressão (WHEELER et al., 2009; STOLER et al., 2012). A taxa de progressão para carcinoma invasivo também parece estar relacionada, em parte, com o genótipo da infecção por HPV oncogênico. Por exemplo, neoplasias pré-invasivas induzidas por HPV dos tipos 16, 18 e 45 progredem para câncer invasivo substancialmente em menor tempo em comparação com neoplasias pré-invasivas induzidas pelo genótipo de HPV 31 e da mesma forma, a idade ao diagnóstico de câncer cervical relacionado aos HPV 16 e HPV 18 é de cinco anos a menos do que para o câncer causado por outros genótipos oncogênicos (STOLER et al., 2012; HAMMER et al., 2016).

1.1.4. Estadiamento do câncer de colo uterino

O estadiamento para o câncer de colo uterino é o mais antigo descrito na literatura, datado em 1928, e graduado de acordo com a extensão da neoplasia. Desde então, este já foi submetido a sete revisões de acordo com a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) (PERCORELI, 2009). Para determinar o grau de estadiamento, é empregado um dos sistemas internacionais, considerando-se o grau de invasão e a presença ou ausência de metástases à distância. Os especialistas usam o estágio do câncer para selecionar e planejar o tratamento mais apropriado disponível (WHO, 2014).

O quadro 2 apresenta a classificação do estadiamento do câncer do colo uterino estabelecido pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia, em colaboração com a Organização Mundial da Saúde e União Internacional de Câncer.

Quadro 2- Estadiamento do câncer de colo uterino

ESTADIO	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
I	Tumor limitado ao colo
Ia	Carcinoma invasivo que apenas é diagnosticado por microscopia, com invasão profunda ≤ 5 mm e extensão ≥ 7 mm
Ia1	Invasão do estroma ≤ 3 mm em profundidade e ≤ 7 mm em extensão
Ia2	Invasão do estroma > 3 mm e ≤ 5 mm em profundidade e ≤ 7 mm em extensão
Ib	Lesões invasivas, clinicamente visíveis, mas limitadas ao colo do útero ou doença microscópica acima de Ia
Ib1	Lesão clinicamente visível ≤ 4 cm na sua maior dimensão
Ib2	Lesão clinicamente visível > 4 cm na sua maior dimensão
II	Carcinoma com invasão para além do útero, mas não atingindo a parede pélvica ou o 1/3 inferior da vagina
Ila	Sem invasão dos paramétrios
Ila1	Lesão clinicamente visível ≤ 4 cm na sua maior dimensão
Ila2	Lesão clinicamente visível > 4 cm na sua maior dimensão
Ilb	Com invasão dos paramétrios
III	Extensão para a parede pélvica e/ou envolvimento do 1/3 inferior da vagina e/ou hidronefrose ou rim não funcionando
IIIa	Envolvimento do 1/3 inferior da vagina sem envolvimento da parede pélvica
IIIb	Extensão para a parede pélvica e/ou hidronefrose ou rim não funcionando
IV	Extensão para além da pélvis ou envolvimento (confirmado por biopsia) da mucosa da bexiga ou reto
IVa	Envolvimento de órgãos adjacentes
IVb	Envolvimento de órgãos à distância

Fonte: Adaptado de FIGO (2009).

1.1.5. Prognóstico das pacientes com câncer de colo uterino

O prognóstico do câncer de colo uterino depende basicamente do estadio clínico no momento do diagnóstico (IARC, 2005). A sobrevida em cinco anos é de quase 100% para pacientes com doença em estadio Ia e entre 70% a 85% para pacientes com doença em estadio Ib1 ou Ila de pequeno volume. Nas mulheres com doença estadio I e Ila tratadas com cirurgia, os fatores associados a um pior prognóstico, além da invasão linfonodal, incluem grande volume tumoral, invasão estromal, envolvimento do espaço linfovascular e extensão da doença para margens vaginais e parametriaes. O volume tumoral está associado tanto à presença de doença extrapélvica quanto à recidiva central após tratamento. Observa-se que a taxa de recidiva do câncer cervical apresenta-se entre 10% a 20% para os estadios Ib a Ila e de 50% a 70% nos casos localmente avançados (estadios

IIB a IVA) (HO et al., 2004; FERNANDES et al., 2011). No Brasil, os valores de sobrevida variam entre 48% e 66,7% (NAKAGAWA et al., 2011; SALES, 2015). Em países desenvolvidos, como Estados Unidos, Austrália, França e Inglaterra, a sobrevida varia de 60% a 70% (WHO, 2014).

A sobrevida das pacientes com câncer de colo uterino apresenta variações de acordo com a idade. No estudo EUROCare-3 a sobrevida relativa em cinco anos dos casos de mulheres entre 15 a 44 anos no momento do diagnóstico foi 74%. A taxa encontrada entre as mulheres com menor idade foi o dobro do que a encontrada em mulheres com idade igual ou superior a 75 anos (34%). A diferença pode estar relacionada a fatores biológicos, crescimento tumoral ou a maior prevalência de doença em comorbidade, como hipertensão e doença cardiovascular em idosas, tornando as pacientes menos propensas a receber o tratamento ideal ou a ter uma relação favorável (IARC, 2005).

1.1.6. Eventos epigenéticos envolvidos no câncer de colo uterino

Os mecanismos de patogênese do câncer de colo uterino não são totalmente esclarecidos. A inativação de genes supressores tumorais e ativação de oncogêneses desempenham um papel importante na carcinogênese (SAAVEDRA et al., 2012).

As oncoproteínas do HPV de alto risco oncogênico E6 e E7 em particular, modulam o processo de transformação alteram o metabolismo da célula hospedeira favorecendo o desenvolvimento neoplásico (DE VILLIERS et al., 2004). A proteína E6 associa-se à proteína p53, que regula a passagem pelas fases do ciclo celular G1/S e G2/M. E6 recruta as proteínas celulares, como é o caso das proteínas da família AP1 (E6-AP) que funcionam como uma ubiquitina ligase; atuando no complexo p53, podendo impedir o efeito supressor da proteína no ciclo celular. A formação desse complexo proteico resulta na ubiquitinação de p53 seguido por sua rápida degradação mediada por um complexo proteossômico. E6, além de reprimir a ação de p53, também tem como função a atividade de telomerase, podendo associar com proteínas ligantes do cálcio ERC55, fatores de resposta do interferon, IRF3, ou, até mesmo, associar a proteínas de integração viral (ZUR HAUSEN, 2000; SCULLY et al., 2002).

A função principal de E7 dos HPV de alto risco é desregular a maquinaria do ciclo celular principalmente pela indução da transição da fase Go/S. Isso é efetuado através da ativação de vários genes celulares pela E7 e pela interação dessa proteína com as proteínas que regulam o ciclo celular (SCULLY et al., 2002). A proteína E7 liga-se às proteínas da família pRb, essa interação permite que E2F atue na ativação constitutiva dos fatores

transcrpcionais, o que levaria à progressão do ciclo celular. E7 também forma complexos com ciclinas A e E, bem como provoca inativação de p21 e p27 (HAUSEN, 2000).

A mutação genética era considerada como o acontecimento principal para patogênese tumoral, especialmente mutações somáticas dos genes supressores tumorais. Com uma compreensão mais aprofundada dos tumores nos últimos anos, evidências têm mostrado que o silenciamento epigenético desses genes é essencial para a carcinogênese e metástase (SAAVEDRA et al., 2012).

O termo epigenética surgiu na metade do século XX após estudos correlacionando bases genéticas e embriológicas. O prefixo “epi”, do grego “por cima”, apresenta uma forma de herança que se sobrepõe à herança genética com base no DNA. A epigenética é definida como as mudanças hereditárias na expressão gênica que não pode ser explicada por uma alteração na sequência de nucleotídeos do DNA. As modificações epigenéticas mais estudadas no DNA são a metilação e a modificação de histonas. O epigenoma é dinâmico e varia de célula para célula dentro de um mesmo organismo multicelular (BHAT et al., 2016).

A metilação da citosina em dinucleotídeos CpG é descrita como um mecanismo de regulação da função epigenética que desempenha um papel importante em diversos processos biológicos como a embriogênese, impressão genômica, inativação do cromossomo X, e vários cânceres (ALBERTS et al., 2010).

Um grande número de estudos em cânceres, incluindo câncer de colo uterino tem focado em identificar perfis de hipermetilação como biomarcadores de câncer em células teciduais ou em células livres na circulação de pacientes, com o objetivo de melhorar a via de tratamento através de diagnóstico precoce preciso, não-invasivo, prognóstico e seleção de terapia prognóstica (VAN DER MEIDE et al., 2011; EISINK et al., 2012; SAAVEDRA et al., 2012; BOERS et al., 2014; HANSEL et al., 2014; RAMOS-SOLANO et al., 2015; BOERS ET AL 2016; HATTORI & USHIJIMA et al., 2016). Estas alterações, em conjunto ou individualmente, permitem estabelecer perfis de metilação, mapas de modificação de histonas, e o perfil de expressão característico do câncer de colo uterino, tornando-se ferramentas úteis para o rastreamento, detecção precoce ou como marcadores prognósticos (BHAT et al., 2016).

1.1.7. Metilação do DNA

A metilação consiste em uma modificação covalente do DNA na qual um grupamento metil (CH₃) é transferido da S-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina (5-MeC) que geralmente precede a uma guanina (dinucleotídeo CpG), pela ação

de uma família de enzimas que recebe o nome de DNA metiltransferase (DNMT). As DNMT estão divididas em duas classes: aquelas envolvidas na metilação de fitas hemimetiladas do DNA (fitas de DNA em processo de replicação), conhecidas como metilases de manutenção como a DNMT1, e outro grupo responsável pela maioria dos processos de metilação *de novo*, que ocorre em sítios sem a presença de metilação prévia, como as DNMT2, DNMT3A e DNMT3B. Os doadores de radical metil são obtidos pela dieta e são principalmente a metionina, seguido de folato, colina e vitamina B12 (ALBERTS et al., 2010).

Os dinucleotídeos CpG aparecem esparsos pelos genomas eucariotos ou agrupados em regiões definidas como ilhas CpG. A maioria dos dinucleotídeos CpG esparsos estão metilados, ao contrário da maioria das ilhas CpG que estão desmetiladas. Essas ilhas são frequentes em regiões promotoras de genes (MORGAN et al., 2004; BHAT et al., 2016).

As alterações no DNA ou perfis de metilação detectada em câncer de colo uterino são de particular interesse, principalmente considerando o fato de que podem ser detectadas em secreções cervicais (RAMOS-SOLANO et al., 2015). Estudos envolvendo os tipos de HPV têm mostrado que a extensão da metilação varia por região do genoma e que alterações no padrão de metilação podem estar associadas com a severidade da neoplasia cervical (SAAVEDRA et al., 2012; RAMOS-SOLANO et al., 2015; BOERS et al., 2016).

1.2. Via de sinalização *int/Wingless* (Wnt)

A via de sinalização Wnt envolve uma grande variedade de fatores de crescimento que regulam a diferenciação, proliferação, migração e oncogênese celular durante o desenvolvimento embrionário. A família de proteínas Wnt codificam moléculas de sinalização ricas em cisteína que controlam diversos processos celulares incluindo a especificação do destino celular, homeostasia tecidual, morfologia e motilidade em vertebrados e invertebrados (CLEVERS & NUSSE, 2012). Tem sido demonstrado que a ativação aberrante da via de sinalização Wnt ocorre durante a carcinogênese, inibindo a apoptose de células tumorais em diferentes cânceres humanos (VAN DER MEIDE et al., 2011; SAAVEDRA et al., 2012; RAMOS-SOLANO et al., 2015; BOERS et al., 2016).

As glicoproteínas Wnts se ligam a cinco receptores transmembrânicos chamados de “Frizzleds”. Os receptores de lipoproteína (LRP) 5 e 6 funcionam como co-receptores essenciais de ligantes de Wnt (PARVEEN et al., 2011). Até o momento os papéis de Wnt foram reconhecidos por três vias distintas: a via canônica/ β -catenina, a via de polaridade celular/planar e a via Wnt/ Ca^{2+} . A via Wnt canônica/ β -catenina foi investigada com maior

detalhe do que as outras duas vias. A β -catenina é um fator chave e funciona como um ativador transcricional da via de sinalização Wnt, que é importante no desenvolvimento embrionário e tumorigenesis, regulando o seu nível e localização sendo fundamental para mediar sinais na via Wnt (WEI et al., 2013).

A Wnt pode induzir a proliferação celular ligando-se ao seu receptor e transmitindo sinais que evitam a degradação de β -catenina o que permite sua translocação para o núcleo, onde age como um ativador da transcrição em conjunto com *T-cell fator* (TCF). Nas células quiescentes, que não são expostas a Wnt, a β -catenina citoplasmática é degradada pelo proteossoma. A via de sinalização Wnt leva a estabilização da β -catenina citosólica (PARVEEN et al., 2011; CLEVERS & NUSSE, 2012) (figura1).

Inibidores naturais de Wnt, por diversas formas regulam em diferentes níveis a sinalização Wnt/ β -catenina, inclusive por proteínas secretadas que antagonizam o ligante Wnt. A função da via de sinalização Wnt ainda não foi totalmente elucidada, no entanto evidências sugerem que a via possua propriedades oncogênicas que podem intensificar o comportamento agressivo de tumores (VAN DER MEIDE ET AL., 2011).

A superexpressão de Wnt, promove a sobrevivência de células através de perda de inibição de contato e dependência de ancoragem, aumento da taxa de formação tumoral, assim como o aumento da migração celular e reorganização da actina. Tem sido sugerido que o silenciamento epigenético de antagonistas da via sinalização Wnt pode resultar na ativação aberrante desta via, conduzindo a carcinogênese (BHAT et al., 2016).

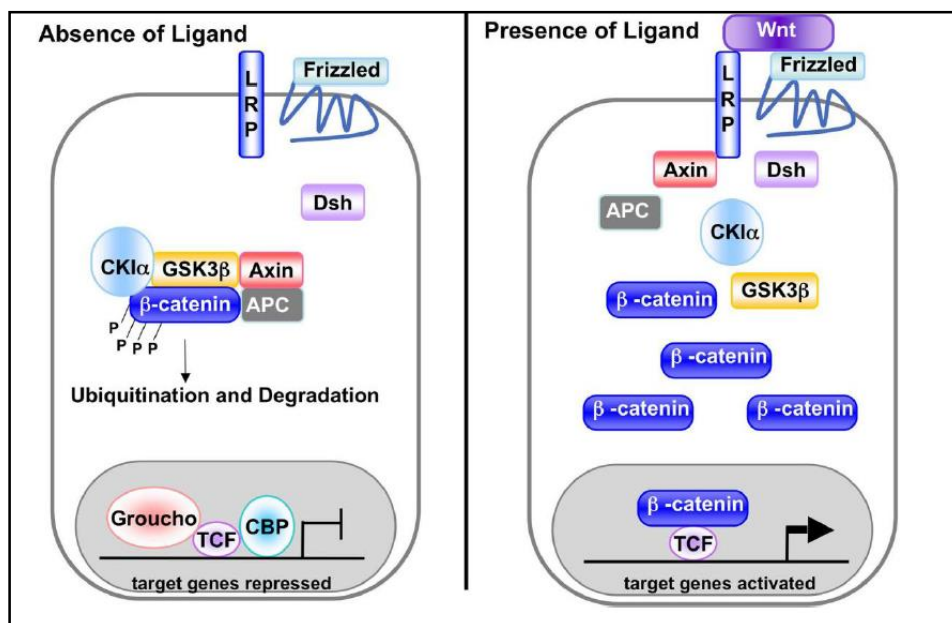


Figura 1- Via de sinalização Wnt canônica.

Fonte: www.wormbook.org/chapters/wwwwntsinaling.

O inibidor de sinalização de Wnt *Dickkopf-3 (DKK3)* é funcionalmente inativado pela metilação da região promotora do gene, alguns estudos indicam que a hipermetilação foi significativamente maior em câncer de colo uterino comparado aos tecidos pré-invasivos (VAN DER MEIDE et al., 2011; KANG et al., 2013). O membro da família *SOX SRY (Sex Determining Region Y) -Box 17(SOX17)*, é conservado em muitas espécies como fator de transcrição e participa de vários processos de desenvolvimento celular e atividades biológicas. Alguns estudos mostraram que *SOX17* também pode desempenhar um papel na carcinogênese humana (VAN DER MEIDE et al., 2011; FU et al., 2011). As proteínas segregadas relacionadas ao “*frizzled*” (*SFRPs*) são moléculas de sinalização extracelular que antagonizam a via de sinalização Wnt. A região promotora do gene *SFRP2* frequentemente apresenta-se metilada em câncer de colo uterino (VAN DER MEIDE et al., 2011).

1.2.1. Inibidores da via de sinalização Wnt

O gene *SOX17* é um membro da família *SOX*, está envolvido no desenvolvimento vascular, formação definitiva da endoderme e dos oligodendrócitos (Genebank, 2017). Ele desempenha um papel crucial na regulação do desenvolvimento e na função das células tronco, pelo menos parcialmente através da repressão da via de sinalização canônica Wnt/ β -catenina (OMIM, 2017).

O gene *DKK3* é um inibidor extracelular da via de sinalização canônica WNT/ β catenina (VAN DER MEIDE ET AL., 2011). Este gene codifica uma proteína que é um membro da família *Dickkopf*. A proteína secretada contém duas regiões ricas em cisteína e está envolvida no desenvolvimento embrionário através das suas interações com a via de sinalização Wnt. A expressão deste gene é reduzida em várias linhagens celulares de câncer, atuando como um gene supressor de tumoral (Genebank, 2017).

Um estudo demonstrou que a presença de hipermetilação do gene *DKK3* é desfavorável para o prognóstico do paciente, quatro de cinco posições estavam fortemente metilada em câncer de colo uterino em comparação com tecido normal. A combinação do nível de metilação, idade, invasão parametrial, e a invasão no espaço linfovascular apresentou uma correlação significativa com a sobrevida (KANG et al., 2013).

O gene *SFRP2* atua como inibidor extracelular da via de sinalização Wnt. Em condições normais, isto é, na ausência de processo carcinogênico, a família de *SFRPs* é responsável por antagonizar a via de sinalização Wnt. *SFRPs* ligam-se diretamente às

proteínas Wnt e bloqueiam sua interação com o receptor transmembrana “*frizzled*”(VAN DER MEIDE et al., 2011).

A família de proteínas *SFRPs* está frequentemente metilada em carcinoma escamoso do colo uterino. CHUNG et al., 2009, relataram que a restauração de *SFRP1* e *SFRP2* poderia suprimir a transformação das células tumorais (CHUNG et al., 2009). Outro estudo, com 23 amostras de adenocarcinoma apontaram a frequência de 82.6% de metilação no gene *SFRP2*, esses achados indicam que o gene também desempenha um papel importante na carcinogênese de células glandulares (LIN et al., 2009).

O quadro 3 aponta as principais características do genes inibidores de via de sinalização Wnt abordados neste estudo.

Quadro 3- Principais características dos genes inibidores da via de sinalização Wnt

Sigla oficial	<i>SOX17</i>	<i>DKK3</i>	<i>SFRP2</i>
Nome completo oficial	<i>SRY (sex determining region Y)-box 17</i>	<i>Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3</i>	<i>Secreted frizzled-related protein 2</i>
Localização cromossômica	8q11.23	11p15.2	4q31.3
Quantidade de éxons	2	9	3
Tipo de gene	Codificação de proteínas	Codificação de proteínas	Codificação de proteínas
Organismo	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
Linhagem	<i>Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.</i>	<i>Eucariotos; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; euarchontoglires; primatas; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.</i>	<i>Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.</i>
Também conhecido como	<i>VUR3</i>	<i>RIG; REIC.</i>	<i>FRP-2; SARP1; SDF-5.</i>

Fonte: Genbank, (2017)

2JUSTIFICATIVA

O câncer de colo uterino é uma doença multifatorial, que pode se desenvolver através de diferentes vias biológicas e moleculares. A infecção por HPV é um pré-requisito para a carcinogênese, mas não é suficiente. Alterações genéticas e epigenéticas no genoma hospedeiro e/ou viral podem influenciar nos desfechos da infecção por HPV (VASILJEVIC, et al., 2014).

A metilação do DNA desempenha um papel crucial para ativar e silenciar genes durante o desenvolvimento normal, portanto, pode contribuir para o desenvolvimento e progressão da carcinogênese do colo uterino (PORTELA & ESTELLER 2010). Algumas modificações como a hipermetilação de genes supressores tumorais foram relacionadas a gravidade da doença em amostras de neoplasias pré-invasivas e em casos de câncer de colo uterino (BHAT et al., 2016).

A análise de biomarcadores preditivos de origem e severidade da lesão podem ser úteis no monitoramento da resposta ao tratamento e na detecção precoce da neoplasia persistente ou recorrente do colo do uterino. O presente estudo agrega informações sobre a carcinogênese, colaborando para o melhor conhecimento da interação entre a metilação dos promotores dos genes inibidores da via de sinalização Wnt, os genótipos de HPV, o grau de diferenciação e sua importância no prognóstico do câncer de colo uterino. A compreensão da forma como estes marcadores se relacionam contribuem para o melhor entendimento do comportamento biológico da neoplasia invasiva escamosa e glandular.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar a prevalência de infecções por genótipos específicos de HPV em câncer de colo uterino e verificar a associação entre a idade, tipo histológico, grau de estadiamento, grau de diferenciação tumoral e a presença da metilação dos genes *SOX17*, *DKK3* e *SFRP2*.

3.2. Objetivos específicos

1. Analisar a prevalência de infecções por HPV em câncer de colo uterino.
2. Analisar a associação entre a infecção por genótipos de HPV e o tipo histológico da neoplasia maligna.
3. Analisar a associação entre a idade e tipo histológico do câncer de colo uterino.
4. Analisar a associação entre a idade e os genótipos de HPV em câncer de colo uterino.
5. Analisar associação entre genótipos de HPV e o grau de estadiamento das neoplasias escamosas e glandulares.
6. Analisar a associação entre a positividade para metilação dos genes *SOX17*, *DKK3* e *SFRP2* com os genótipos específicos de HPV.
7. Analisar a interação entre a metilação dos genes *SOX17*, *DKK3* e *SFRP2*, os genótipos de HPV e o grau de estadiamento e diferenciação do câncer de colo uterino.
8. Analisar a associação entre a positividade da metilação dos genes *SOX17*, *DKK3* e *SFRP2* os carcinomas de células escamosas e adenocarcinomas.

4 MÉTODOS

4.1. Desenho do estudo

Estudo do tipo corte transversal constituído por dois grupos. O primeiro grupo corresponde a mulheres com diagnósticos histopatológicos de carcinomas de células escamosas, o segundo grupo composto por mulheres com diagnósticos de adenocarcinomas.

4.2. Tamanho amostral

O tamanho amostral foi de 214 casos, identificados a partir de prontuários dos exames anatomopatológicos realizados no Departamento de Anatomia Patológica no Hospital Araújo Jorge em Goiânia-Go, o período de inclusão foi a partir de 2006 até 2010.

4.3. Seleção de sujeitos

A seleção foi realizada a partir de uma busca ativa nos registros informatizados dos exames anatomopatológicos realizados no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge em Goiânia-GO - Brasil, com os diagnósticos histopatológicos já especificados. As lâminas coradas por hematoxilina-eosina de cada exame anatomopatológico foram revistas pela equipe de patologia do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge, os casos selecionados de acordo com o diagnóstico histológico obtido. Os blocos de parafina correspondentes às lâminas observadas foram separados para realização das técnicas moleculares.

4.3.1. Critérios de inclusão

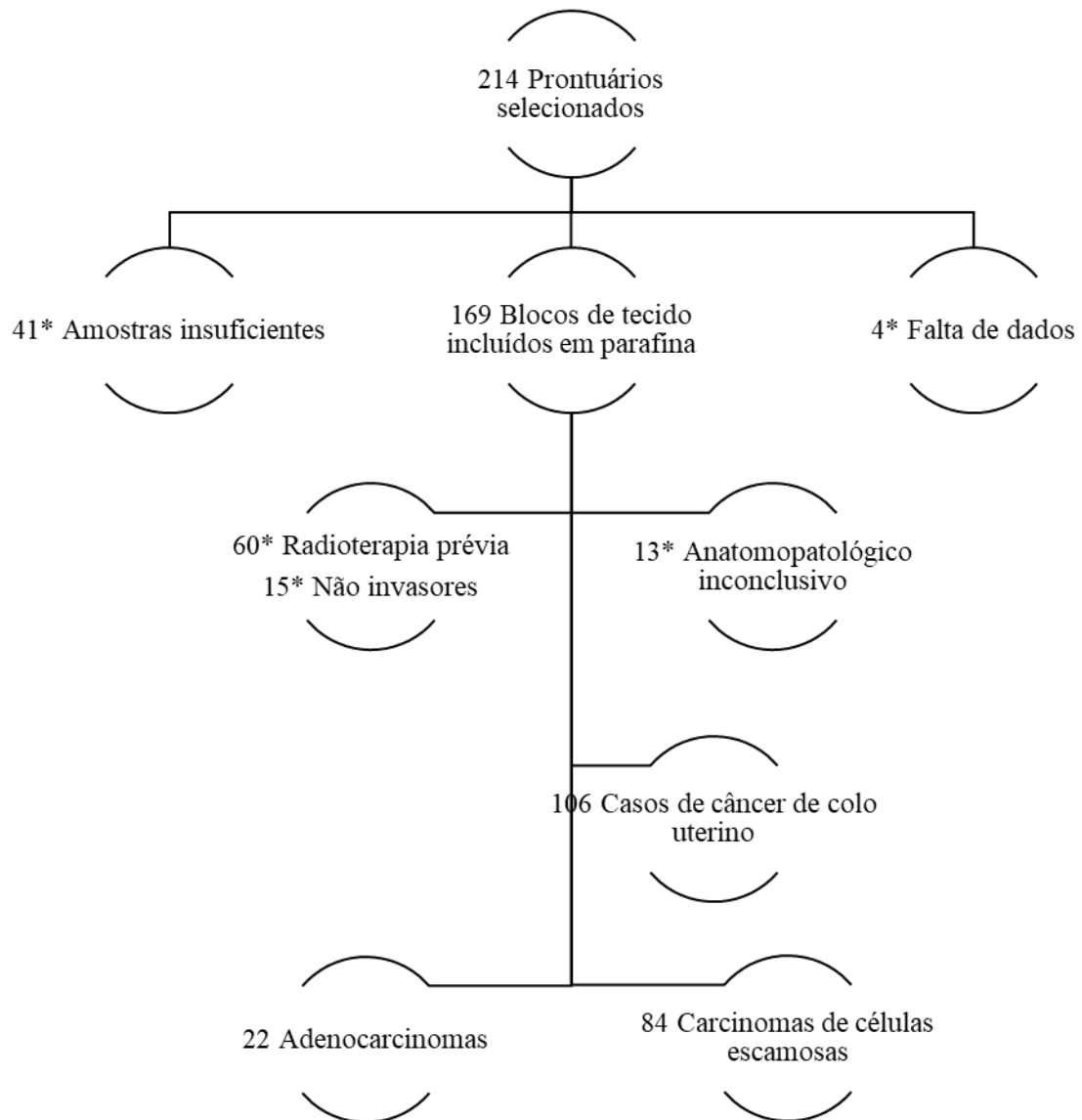
Mulheres com diagnóstico do exame anatomopatológico de carcinoma de células escamosas e ou adenocarcinomas do colo uterino.

4.3.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos os casos sem as informações dos prontuários completamente preenchidas, biópsias realizadas após tratamento com radioterapia e amostras cujo DNA não tenha sido suficiente para a realização de todas as técnicas moleculares previstas.

4.3.3 Fluxograma de distribuição dos casos

Figura 2- Fluxograma de casos



*Exclusão

4.4. Técnicas, testes e exames

4.4.1. Diagnóstico histopatológico

Os espécimes de biópsia foram corados com hematoxilina e eosina, revisados de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde e classificados como: carcinoma de células escamosas invasivo ou adenocarcinoma cervical invasivo (KURMAN, 2014).

4.4.2. Análise molecular

4.4.2.1. Extração e avaliação do DNA presente na amostra

Após a seleção, os cortes dos blocos parafinados foram utilizados para a extração de DNA. Essa etapa foi realizada no espaço físico do Laboratório de Genética e Biodiversidade da Pontifícia Universidade Católica de Goiás – Goiânia – Brasil. Para remover a parafina, foram adicionados 750µL de xilol P.A. (Vetec®, Brasil) ao tubo contendo os cortes, seguida por agitação vigorosa por 1 minuto, centrifugação por 15 minutos a 12000 rpm e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Essa etapa foi feita duas vezes para garantir máxima remoção da parafina. Em seguida, 500µL de etanol P.A. (Vetec®, Brasil) foram adicionados e os tubos agitados vigorosamente por 30 segundos, centrifugados por 15 minutos a 12000 rpm e o sobrenadante foi removido por inversão do tubo. Ao precipitado foram adicionados 500 µL de etanol diluído a 50%, seguida de agitação vigorosa por 30 segundos, centrifugação por 15 minutos a 12000 rpm, e o sobrenadante foi removido por inversão do tubo. O tecido secou por 24 horas à temperatura ambiente.

Ao tecido seco foram adicionados 300µL de proteinase K (Invitrogen®, EUA) diluída a 0,1% em tampão de dodecil-sulfato de sódio (SDS) com pH 9,0 e incubado por no mínimo 24 horas, a 55°C e sob agitação leve. Após esse período, foram adicionados 300µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1 e pH 8,0 – Invitrogen®, EUA), os tubos foram agitados vigorosamente por 1 minuto e centrifugados por 15 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante, constituído pela fase aquosa, foi separado em um tubo novo e a ele foram acrescentados 100µL de acetato de amônio 7,5M (Sigma-Aldrich®, EUA) e 1000µL de etanol P.A. gelado. A mistura foi homogeneizada por inversão do tubo e o DNA foi precipitado por até 24 horas a -20°C. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 12000 rpm e a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo. Para lavagem do DNA precipitado, foram adicionados 1000µL de etanol diluído a 70% e gelado, a homogeneização foi feita por inversão dos tubos e estes foram centrifugados por 15 minutos a 12000 rpm e a 4°C. Essa etapa foi realizada duas vezes e, ao final da segunda lavagem, o DNA secou à temperatura ambiente por aproximadamente duas horas. A

ressuspensão foi feita com 50µL de água Mili-Q estéril. Em seguida o DNA ressuspensão ficou em repouso por uma hora na temperatura de 37°C, foi quantificado utilizando o NanoDrop® (Thermo Scientific®, EUA). Todo o material obtido foi estocado a -20°C.

4.4.2.2. Detecção e genotipagem de HPV

A detecção e genotipagem de HPV foram realizadas no Centro de Investigação Translacional em Oncologia - Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – USP – São Paulo – Brasil. Exclusivamente essa etapa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás.

Para a realização da técnica foram utilizados os kits comerciais INNO-LiPA HPV Genotyping Extra AMP® (Innogenetics®, Bélgica) e INNO- LiPA HPV Genotyping Extra® (Innogenetics®, Bélgica), respectivamente. Esse é um ensaio comercial baseado no princípio de hibridização reversa, projetado para identificação de genótipos do vírus HPV através da detecção de sequências específicas na região *L1* do genoma do HPV. Essas sequências foram amplificadas por iniciadores SPF10 (65 pares de bases) biotinizados, desnaturados e hibridizados com sondas específicas fixadas em linhas paralelas em tiras de membrana de nylon. O ensaio permite a detecção simultânea e independente de 15 genótipos de HPV de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82), 3 de provável alto risco (26, 53 e 66), 7 de baixo risco (HPVs 6, 11, 40, 43, 44, 54 e 70) e três que não são classificados quanto ao risco (69, 71 e 74). Todas as instruções do fabricante foram seguidas para realização dos testes. Para a detecção e genotipagem de HPV, utilizou-se 100ng do DNA extraído e o equipamento automatizado Autoblott 3000H® (Fujirebio®, Bélgica).

4.4.2.3. Tratamento do DNA com bissulfito de sódio

O DNA extraído a partir dos tumores cervicais foram tratados com bissulfito de sódio, que promove a desaminação de citosinas não metiladas em uracilas, as quais são substituídas por timinas durante a síntese de uma nova fita de DNA. As citosinas metiladas (5-metilcitosinas) são mantidas intactas e permanecem como citosinas após a reação de amplificação (quadro 4). Essa etapa foi realizada no Laboratório de Genética e Biodiversidade da Pontifícia Universidade Católica de Goiás – Goiânia – Brasil.

O kit empregado para tratar o DNA com bissulfito de sódio foi *EpiTect® Bisulfite kit* Qiagen, corresponde aos seguintes passos: inicialmente, 2µg de DNA genômico foi misturado a 85 µl de *mix* de bissulfito e 35µl tampão protetor de DNA. As amostras foram incubadas por 5 horas em termociclador obedecendo as recomendações do fabricante. Nessa fase foi realizada a modificação do DNA por bissulfito de sódio. Após o processo

de conversão o material foi transferido para colunas, adicionou-se tampão de ligação (BL) que coopera na ligação do DNA convertido à coluna, centrifugado por 1 minuto. Posteriormente foi adicionado tampão de lavagem (BW) e centrifugado, seguido por adição de tampão de dessulfonização (BD) e novo ciclo de centrifugação por 1 minuto. Após o processo de dessulfonização as amostras foram submetidas a duas lavagens com BW, e o DNA foi recuperado em 40µl de solução de eluição.

Quadro 4 - Conformação do DNA prévia e seguida ao tratamento com bissulfito de sódio

DNA	Sequência original	Após tratamento com bissulfito
Não metilado	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N- U -G-N- U -G-N- U -G-N
Metilado	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N- C -G-N- C -G-N- C -G-N

Fonte: Handbook EpiTect *EpiTect® Bisulfite kit Qiagen* (2012, p2)

4.4.2.4. Análise do perfil de metilação através de M-PCR

O DNA tratado com bissulfito de sódio converte as bases de citosina não metiladas em uracila, que é reconhecida por iniciadores de PCR como timina. A desaminação da citosina remove o grupo amina da posição 4, e isso a converte em uracila pareando com adenina ao invés de parear com guanina (do par C-G altera-se para U-A), a metilação da citosina no carbono 5 a transforma em metilcitosina, que, se for desaminada, tornar-se-á timina, com um oxigênio no lugar da amina.

As análises de metilação foram realizadas no Laboratório de Genética e Biodiversidade da Pontifícia Universidade Católica de Goiás – Goiânia – Brasil. As amostras foram submetidas a *methylation specific PCR* (M-PCR), os iniciadores utilizados para a detecção da metilação das regiões promotoras dos genes já definidos estão descritos no quadro 5. O gene β -actina foi incluído como um controle para avaliação da integridade da amostra e da conversão bissulfito.

Para a identificação da metilação, foram utilizados iniciadores que amplificam as ilhas CpG compreendidas na região promotora de cada gene, para análises da reação de M-PCR optou-se por iniciadores já descritos na literatura facilitando a padronização das reações de amplificação (VAN DER MEIDE et al., 2011). A reação de M-PCR foi realizada utilizando as seguintes concentrações: 1mM de DNA modificado, 0,5 µM do conjunto de iniciadores, cada dNTP a 200 µM, FastStart Taq PCR buffer MgCl₂ a 3 mM e Taq DNA polimerase 1,25 U (Roche Diagnostics), enhancer e água miliq suficiente para volume final de 25 µl. Os controles positivos para a metilação foram amostras de DNA

extraídos das linhagens celulares *SiHa*, *HeLa*, água miliq autoclavada foi utilizada como controle negativo da reação.

Quadro 5 - Sequências de iniciadores utilizados na M-PCR

<i>Iniciador</i>	Senso	Antisenso	Pares de base	Temperatura de anelamento
<i>SOX17</i>	GGGATCGGTTTCGTT TTCGTC	AACCGACCTAATAA CACTACGAACG	91	56,2 °C
<i>DKK3</i>	TTAATGAGATGTTT CGCGAGGTT	ACCGCGCTACGCAA TTTATACT	67	54,7 °C
<i>SFRP2</i>	CGTTTTAGTCGTCG GTTGTTAGTTT	TCCCGAACCCGCTC TCTT	69	55,6 °C
<i>ACTB</i> (Controle)	TGGTGATGGAGGAG GTTTAGTAAGT	AACCAATAAAACCT ACTCCTCCCTTAAA	133	57,2 °C

Fonte: VAN DER MEIDE et al. (2011)

4.5 Coleta de dados

Os dados obtidos através dos prontuários foram transcritos manualmente para uma ficha de registro especialmente elaborada para este estudo. As informações incluíam: a identificação das pacientes através do seu número de matrícula, iniciais do nome, número do exame anatomopatológico, respectivos diagnósticos histológicos, o tipo de HPV presente na amostra, resultados das reações moleculares de metilação, estadiamento e grau de diferenciação tumoral. Os dados foram revistos para correção do preenchimento e inseridos em planilha digital (tipo Excel®).

4.6. Processamento e análise dos dados

4.6.1. Variáveis dependentes

Diagnóstico histopatológico de câncer de colo uterino incluindo:

- Carcinomas de células escamosas.
- Adenocarcinomas.

–4.6.2. Variáveis independentes

- Metilação dos genes *DKK3*, *SFRP2* e *SOX17*.
- Genótipo de HPV presente na amostra.
- Estadiamento da neoplasia cervical escamosa ou glandular.

Os dados foram expressos como porcentagens do total de casos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism* versão 4.0. A associação entre as variáveis foram analisadas utilizando o teste qui-quadrado e o teste exato de Fischer quando necessário. Um *p-valor* de ≤ 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

4.7. Aspectos éticos

A pesquisa foi realizada a partir do parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Araújo Jorge correspondente ao número 867330 datado em 05/11/2014.

Neste estudo foram respeitados os princípios enunciados na *Declaração de Helsinque*, mantendo-se em sigilo a identidade das pacientes, cujos dados foram identificados apenas pelo número de registro no projeto. A princípio, as análises realizadas neste estudo não implicam em quaisquer modificações no tratamento da doença e em momento algum serão introduzidas condutas adicionais. Não foram previstos quaisquer riscos ou transtornos às pacientes, pois toda a pesquisa foi realizada através da revisão de lâminas histológicas e manuseio dos respectivos blocos de parafina.

Por ser um estudo retrospectivo e não havendo possibilidade de contatar muitas das mulheres tratadas e sendo uma pesquisa com baixo nível de risco, considerou-se que a assinatura de um termo de consentimento não seria aplicável. Entretanto, se ocorrer alguma descoberta que possa modificar positivamente o tratamento e acompanhamento das pacientes, o fato será reportado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Araújo Jorge.

5 ARTIGOS

Artigo 1 – Age and HPV detection in women with invasive cervical cancer

Kelly Deyse Segati¹, Vera Aparecida Saddi², Megmar Aparecida dos Santos Carneiro¹, Luisa Lina Villa³, Keila Patrícia Almeida de Carvalho¹, Luciana Ximenes Salustiano⁴, Giana Rabello Mota⁵, Lara Termini⁵, Luiz Carlos Zeferino⁶, Silvia Helena Rabelo-Santos^{1,7}

Revista: Oncotarget.

Artigo 2 – Cervical cancer: an analysis of the methylation frequency of inhibitors WNT signalling pathway

Kelly Deyse Segati¹, Vera Aparecida Saddi², Rosane Ribeiro Figueiredo Alves³, Megmar Aparecida dos Santos Carneiro¹, Keila Patrícia Almeida de Carvalho¹, Luciana Ximenes Salustiano⁴, Lara Termini⁵, Walmirton Bezerra D'Alessandro⁶, Luiz Carlos Zeferino⁷, Luisa Lina Villa⁸, Silvia Helena Rabelo-Santos^{1,6}.

Revista: Plos One.

Artigo 1 **Age and HPV detection in women with invasive cervical cancer**

Kelly Deyse Segati¹, Vera Aparecida Saddi², Luisa Lina Villa^{3,4}, Keila Patrícia Almeida de Carvalho¹, Megmar Aparecida dos Santos Carneiro¹, Luciana Ximenes Salustiano⁵, Giana Rabello Mota⁴, Lara Termini⁴, Luiz Carlos Zeferino⁶, Silvia Helena Rabelo-Santos^{1,7}

¹ Institute of Tropical Pathology and Public Health, Universidade Federal de Goiás; Goiânia, GO, Brazil.

² Program in Environmental Sciences and Health, Pontifícia Universidade Católica de Goiás; Laboratory of Oncogenetics and Radiology, *Associação de Combate ao Câncer*; Goiânia, GO, Brazil.

³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia das Doenças Associadas ao Papilomavírus, Santa Casa Research Institute, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; São Paulo, SP, Brazil.

⁴Center for Translational Investigation in Oncology, ICESP - Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, School of Medicine, Universidade de São Paulo; São Paulo, SP, Brazil.

⁵Department of pathological anatomy, Hospital Araújo Jorge/Associação de Combate ao Câncer em Goiás; Goiânia, GO, Brazil.

⁶Department of Obstetrics and Gynecology, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); Campinas, SP, Brazil.

⁷School of Pharmacy, Universidade Federal de Goiás; Goiânia, GO, Brazil.

Correspondence:

Silvia Helena Rabelo dos Santos

Faculdade de Farmácia – UFG, Rua 240 S/N, Setor Leste Universitário

74605-170 Goiânia, GO, Brazil.

Telephone: +55 62 3209-6457; Fax: + 55 62 3209-6044

E-mail: shrabelo@ufg.br; kellysegati@hotmail.com

Keywords: cervical cancer; Human papillomavirus; age distribution; adenocarcinoma; squamous cell carcinoma.

ABSTRACT

Cervical cancer is the second most common type of cancer in women. Infection by high-oncogenic risk human papillomaviruses (HPV) is the principal causal factor of the development of cervical cancer. HPV 16 and 18 predominate in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas, followed by HPV 45. The objective of this study was to evaluate the specific HPV genotypes present in women diagnosed with cervical cancer and identify any associations with age, staging and histological type. A total of 106 paraffin-embedded tissue blocks from biopsies performed in cervical cancer patients were selected. HPV detection and genotyping were performed using the INNO-LiPA HPV Genotyping assay (Innogenetics). Infection by HPV 18 and 45 and age <50 years were factors associated with a diagnosis of adenocarcinoma. Women testing positive for HPV 18 and 45 were 5.41 times more likely to be under 50 years of age compared to those testing positive for HPV 16. Positive associations were found between being ≥ 50 years of age and advanced stages of cervical cancer, with this age group also being associated with squamous cell carcinoma. In patients with a diagnosis of adenocarcinoma, age was not associated with advanced stages. These results show that the women with adenocarcinoma of the cervix were significantly younger than those with a diagnosis of squamous cell carcinoma. HPV genotypes 18 and 45 were positively associated with a diagnosis of adenocarcinoma in younger women.

INTRODUCTION

Cervical cancer is a preventable disease; however, it remains one of the major causes of death from cancer in women worldwide. In 2012, 528,000 new cases of cervical cancer were diagnosed and 266,000 women died from the disease, with the majority of cases occurring in low and middle-income countries [1,2].

Oncogenic humanpapillomavirus (HPV) types are the principal etiological agents of cervical cancer, being responsible for practically all cases of cervical cancer. The International Agency for Research on Cancer (IARC) recognizes 14 types of HPV as being oncogenic: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68 [3]. The connection between HPV infection and cervical cancer is already well established in the most common histological types such as squamous cell carcinomas, adenocarcinomas and adenosquamous carcinomas [4].

Squamous cell carcinoma is an invasive tumor that affects the cells covering the ectocervix. The majority of these tumors are situated at the squamocolumnar junction, which consists of the non-keratinized, stratified squamous epithelium of the ectocervix and the simple, non-ciliated columnar epithelium of the endocervix [4]. Squamous cell carcinoma is the most common histological type of cancer, accounting for approximately 80-85% of cases of cervical cancer. Adenocarcinomas originate in the endocervix and represent 10-15% of cases, while mixed tumors such as adenosquamous carcinomas are diagnosed in 2-3% of cases [5].

Aging is an important risk factor for the development of cancer, although persistent HPV infection remains the primary factor. There are indications that the prevalence of HPV 16 and 18 declines proportionally as the age of the patient diagnosed with cervical cancer increases, while the prevalence of other HPV genotypes increases [6].

Infection by HPV 16 and 18 may be more common in younger compared to older women with cervical cancer [6-8]. The differences in the prevalence of HPV genotypes as a function of age could be related to the rapid progression of precursor lesions positive for HPV genotypes 16 and 18 compared to the speed of progression of lesions resulting from other oncogenic genotypes [7-9]. This hypothesis can be explained by the fact that genotypes 16 and 18 usually form an integrated part of the host genome while other genotypes such as 33 and 31 are mostly episomal [7]. Studies have reported that age at cervical cancer diagnosis is five years less in cases associated with HPV 16 and 18 compared to cases associated with other oncogenic genotypes [10,11].

Cervical cancer is a multifactorial disease that can develop through different biological routes. There is little information in the literature associating the origin and severity of cervical cancer with HPV genotypes and age in relation to prognosis. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the specific HPV genotypes in women with a diagnosis of cervical cancer and test the associations with age, staging and histological type.

RESULTS

The age of the patient at cervical cancer diagnosis ranged from 26 to 91 years, with a mean of 52.3 years (95% confidence interval [95%CI]: 49.3 - 54.7). The mean age of the patients with a diagnosis of adenocarcinoma was 46 years (95%CI: 40.7 - 51.3) compared to 53.9 years (95%CI: 49.7 - 56.2) for the women with a diagnosis of squamous cell carcinoma. Women diagnosed with an adenocarcinoma were significantly younger than those diagnosed with a squamous cell carcinoma ($p=0.04$) (Table 1).

Overall, a diagnosis of cervical cancer was more common in the 60-69 year age group (25.5%). In 79.2% of all cases, the diagnosis was of squamous cell carcinoma, with 20.7% of the women being diagnosed with an adenocarcinoma. The prevalence of squamous cell carcinoma was greater in women in the 60-69-year age group (29.8%), while adenocarcinomas were more prevalent (50.0%) in women of 40-49 years of age (data not shown as table).

HPV 16 was the most prevalent genotype, being detected in 70.9% of cases. In 56.6% of these cases, HPV 16 was found as a single infection and in 14.3% in combination with other HPV types. HPV 18 was found in 12 cases: in 7.5% as a single infection and in combination with HPV 16 in 3.8%. The third most common genotype in this population was HPV 33, which was present in 5.7% of cases. The HPV 45 genotype was found in 3.8% of cases, while HPV 52, 53 and 31 accounted each for 1.9% of the total prevalence. All multiple high-oncogenic risk HPV infections included HPV 16 as one of the HPV types. HPV genotypes 56, 39, 35 and 58 were each detected in 0.9% of all samples (Table 2).

Positivity for HPV 16 as a single infection or multiple infection was significantly associated with a diagnosis of squamous cell carcinoma (odds ratio [OR] = 5.66; 95%CI: 1.49 - 21.54; $p=0.006$), taking cases that were positive for HPV 18 and HPV 45 as a reference. The same association was found for cases with a diagnosis of adenocarcinoma that tested positive for HPV genotypes 18 and 45, taking cases that tested positive for HPV 16 as a reference (OR = 5.66; 95%CI: 1.49 - 21.54; $p = 0.006$). The specimens that tested positive for HPV 16, HPV 18 and HPV 45, although more prevalent in cases of squamous cell carcinoma, were not significantly associated with any specific histological type (OR = 0.67; 95%CI: 0.17 - 2.54; $p=0.75$) compared to the samples that tested positive for other HPV genotypes or that tested negative (Table 3).

A significant association was found between age <50 years at the time of cervical cancer diagnosis and a histological diagnosis of adenocarcinoma (OR = 4.31; 95%CI: 1.45 - 12.80; $p = 0.007$). The same association was found between women ≥ 50 years of age and a diagnosis of squamous cell carcinoma (OR = 4.31; 95%CI: 1.45 - 12.80; $p = 0.007$). Positivity for HPV 16, HPV 18 and HPV 45 genotypes was not associated with age at the time of diagnosis, taking infections with other HPV genotypes as a reference (OR = 1.22; 95%CI: 0.48 - 3.07; $p = 0.81$). Nevertheless, women <50 years of age with cervical cancer were 5.41 times more likely to test positive for HPV 18 and 45 when compared to those infected with HPV 16 (Table 4).

Stage ranged from Ia to IVb, with stage IIIb being the most common (19.8%). There was a greater prevalence of stage IIIb in women with a diagnosis of squamous cell carcinoma (21.3%); however, 73.7% of cases were diagnosed at lower stage. Regarding a diagnosis

of adenocarcinoma, the distribution of stages was similar and the majority of cases (68.7%) were also diagnosed at lower stage (data not shown as table).

Stages III and IV were associated with age ≥ 50 years (OR = 4.92; 95%CI: 1.87 - 12.94; p = 0.0009). Stages III and IV were associated with a diagnosis of squamous cell carcinoma in patients ≥ 50 years of age (OR = 7.69; 95%CI: 1.59 - 15.58; p = 0.001). Nevertheless, in patients with a diagnosis of adenocarcinoma, no statistically significant association was found between age ≥ 50 years and stages III and IV (OR = 4.87; 95%CI: 0.83 - 7.79; p = 0.27) (Table 5).

DISCUSSION

This study showed that the prevalence of cervical cancer was higher in women in the 40-49-year and 60-69-year age groups. Women with adenocarcinoma of the cervix were significantly younger than those with a diagnosis of squamous cell carcinoma. HPV 16 was positively associated with a diagnosis of squamous cell carcinoma, while HPV 18 and 45 were associated with cases of adenocarcinoma, even when taking one as a reference for the other. A diagnosis of adenocarcinoma was positively associated with age <50 years, while a diagnosis of squamous cell carcinoma was significantly more prevalent in women ≥ 50 years of age. Another interesting finding was that HPV 18 and HPV 45 infections were significantly more common in women under 50 years of age. Taking this whole sample of women with cervical cancer into consideration, the detection of more advanced stages of the disease (III and IV) at diagnosis was significantly associated with age ≥ 50 years. This was also true for the specific cases of squamous cell carcinoma but not for those of adenocarcinoma.

In this sample, there was a higher prevalence of women in the 60-69-year age group. In Brazil, screening programs cover women of 25 to 64 years of age; however, the findings of the present study show that 20.8% of the women were diagnosed with cervical cancer after 64 years of age. Defining the age at which to end cervical cancer screening is a controversial issue, with current thinking being that screening should be stopped for women over 65 years of age with a history of negative exams [12]. On the other hand, a report suggested that the incidence of cervical cancer continues to rise with age, and that the most appropriate approach would be to continue screening until at least 69 years of age in women with an intact uterus [13].

The present findings highlight differences in age at the time of diagnosis of cervical cancer. The women diagnosed with an adenocarcinoma were significantly younger compared to those with a diagnosis of squamous cell carcinoma. Ruengkhachorn et al. [14] reported a trend towards a diagnosis of adenocarcinoma in younger women compared to those with a diagnosis of squamous cell carcinoma. However, not all authors agree on this point. Oliveira et al. [15] conducted a study in the state of São Paulo, Brazil, and showed that the women with adenocarcinomas were similar in age to the women with a diagnosis of squamous cell carcinoma.

Overall, 97.2% of the present cases tested positive for HPV infection: 100% of cases of squamous cell carcinoma and 86.4% of adenocarcinomas. Zheng et al. [16] conducted a study with 427 women with cervical cancer and reported positivity for high-oncogenic risk HPV in 92%. Those authors showed that 95% of the cases of squamous cell carcinoma

tested positive for high-oncogenic risk HPV compared to 75% of the cases of adenocarcinoma.

This study found a prevalence of 82.2% of high-oncogenic risk HPV genotypes 16, 18 and 45: 70.9% for HPV 16, 7.5% for HPV 18 and 3.8% for HPV 45. HPV 16 and 18 are responsible for around 70% of cervical cancer cases worldwide [17]. Indeed, HPV 16 and 18 have been found in 71% of cases of cervical cancer in a retrospective worldwide survey, with genotypes 16, 18 and 45 being found in 94% of cases of adenocarcinoma and in 75% of cases of squamous cell carcinomas [9].

In the present study, HPV 33 was the third most prevalent genotype. An interesting point made by Tjalma et al. [8] refers to the frequency of diagnoses of cervical cancer associated with HPV genotypes HPV 33 and 31. Those authors suggest that the presence of these genotypes in cervical cancer diagnoses has increased over the years. De Sanjose et al. [9] found a prevalence of 4% each for HPV 33 and HPV 31 in cervical cancer, particularly in cases of squamous cell carcinoma, making these the fourth most prevalent HPV genotypes in cervical cancer.

The patients who tested positive for HPV 16 in the present sample were 5.66 times more likely to have a squamous cell carcinoma compared to the patients who tested positive for HPV 18 and HPV 45. Furthermore, patients who tested positive for HPV 18 and HPV 45 were similarly more likely to have a diagnosis of adenocarcinoma compared to those who tested positive for HPV 16. In a multicenter study, Castellsagué et al. [18] showed a clear association between HPV 16 and 18 and cervical adenocarcinomas, with ORs of 164.1 and 410.3, respectively. Rabelo-Santos et al. [19] conducted a study in Brazil and detected

HPV 16 in 66% of cases of adenocarcinoma of the cervix, while HPV 18 was found in 34% of cases; however, this type was more prevalent in glandular neoplasms. De Sanjose et al. [9] also showed that HPV 18 and HPV 45 together were significantly more common in cases of adenocarcinomas than in cases of squamous cell carcinomas.

The prevalence of infection by HPV 16 and HPV 18 may decrease with increasing ages at diagnosis of cervical cancer, ranging from 74.8% in women of 30-39 years of age to 56.8% in women over 70 years of age; therefore, these genotypes are more commonly found in younger women [6]. Serrano et al. [20] concluded that the relative contribution of HPV 16, 18 and 45 decreases with age, while the relative contribution of HPV 31, 33, 52 and 58 increases.

The Gynecologic Cancer Inter Group consensus review stated that the epidemiological characteristics of a diagnosis of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma are similar; however, adenocarcinomas differ by being associated with obesity, exogenous estrogen and younger age [21]. Knowledge on the distribution of cervical cancer according to age group has proved relevant in defining the strategies used to control the disease [22]. This study showed that women under 50 years of age had a 4.31-fold greater risk of being diagnosed with an adenocarcinoma compared to women ≥ 50 years of age. Ruengkhachorn et al. [14] found that a diagnosis of adenocarcinoma represented 23.2% of cases of invasive carcinoma. Those authors also found a younger age trend for this type of tumor and reported that adenocarcinomas required more aggressive surgical treatment compared to the cases of squamous cell carcinoma ($p = 0.048$).

In the present study, an association was found between the presence of HPV 18 and HPV 45 and age <50 years. This may be related to the association of these genotypes with a diagnosis of adenocarcinoma, which was also associated with that age group. Indeed, 83.3% of the cases that tested positive for HPV 18 and HPV 45 were detected in women under 50 years of age. De Sanjose et al. [9] found an association between the age of the women at diagnosis of cervical cancer and positivity for HPV 18 or 45. In that study, women positive for HPV 18 or 45 were significantly younger than those positive for HPV 16 or other high-oncogenic risk HPV genotypes.

The variation in the prevalence of HPV genotypes that occurs according to age may be the result of a faster progression of precursor lesions containing genotypes HPV 16 and 18 compared to precursor lesions that are positive for other carcinogenic genotypes. This may happen because genotypes 16 and 18 are more often integrated into the host genome, while other genotypes such as 31 and 33 are more commonly episomal compared to genotypes 16 and 18 [6].

HPV 16 has been shown to be the most prevalent HPV genotype in squamous cell carcinomas, being found in 50-60% of cases, whereas HPV 18 occurs in 10-20% of cases. HPV 18 is found in 40-60% of cases of adenocarcinoma. Oncogenic viruses such as HPV 45 and 31 contribute to the remaining 7-9% of adenocarcinomas [9,23,24].

In summary, the HPV 16, 18, 33 and 45 genotypes are commonly involved in cervical cancer in Brazil. The presence of HPV 16 infection was associated with a diagnosis of squamous cell carcinoma, while the HPV 18 and 45 genotypes were associated with a diagnosis of adenocarcinoma. Being under 50 years of age was associated with a diagnosis

of adenocarcinoma and with a greater likelihood of positivity for HPV 18 and 45 rather than HPV 16. The results of the present study provide further data on the distribution of HPV genotypes and the histological type and age of patients with a diagnosis of cervical cancer in Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Study design

This was a cross-sectional study involving 214 cases of women with cervical cancer divided into two groups, the first group consisting of women with a histological diagnosis of squamous cell carcinoma and the second of women with a diagnosis of adenocarcinoma. The cases were identified from the records of the Pathology Department of the Araújo Jorge Hospital in Goiânia, Goiás, Brazil, between 2006 and 2010. The institutional review board approved the study protocol 867.330.

Sample selection

An active search for cases with already defined histopathology diagnoses was conducted using the database at the Pathology Department of the Araújo Jorge Hospital. The hematoxylin-eosin stained slides were reviewed and the cases were then selected according to the histological diagnosis obtained. The paraffin blocks corresponding to those slides were separated to perform further testing using molecular techniques.

The flowchart depicted in Figure 1 illustrates the procedure for the selection of cases. Forty-one cases were excluded because the histological material was insufficient to enable analyses to be performed, four due to missing data and fifteen because diagnosis was of a

non-invasive lesion. Therefore, a total of 154 paraffin-embedded tissue blocks were selected. At this stage, a further check was performed and another 48 samples were excluded, 40 because the patient had been submitted to radiotherapy previously and 8 because the pathology results were inconclusive. Therefore, the final group consisted of 106 cases of invasive cervical cancer: 84 cases of squamous cell carcinoma and 22 cases of adenocarcinoma.

Histological diagnosis

The biopsy specimens were stained with hematoxylin and eosin, reviewed according to the World Health Organization (WHO) criteria and classified as invasive squamous cell carcinoma or invasive adenocarcinoma of the cervix [25].

Molecular analysis

Following selection of the specimens, DNA was extracted from paraffin block sections. The paraffin was removed using organic solvent, digestion was performed with proteinase K, and a purification step followed with phenol/chloroform/isoamyl alcohol. The samples were then submitted to DNA quantification and polymerase chain reaction (PCR) using the primers for GAPDH to evaluate DNA quality and avoid false-negatives. Only samples at a concentration of 50 ng/ml of DNA were used.

HPV detection and genotyping were performed using the INNO-LiPA HPV Genotyping Extraassay (Innogenetics NV, Ghent, Belgium), which is based on the reverse hybridization principle, designed to identify HPV genotypes by detecting specific sequences in the L1 region of the HPV genome. These sequences were amplified and using SPF₁₀ primers (65pb), hybridized with specific probes fixed in parallel lines in strips of

nylon membrane. The assay permits the simultaneous and independent detection of 15 high-risk HPV genotypes (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 and 82) three likely high-risk (26, 53 and 66) seven low-risk HPV genotypes (6, 11, 40, 43, 44, 54 and 70) and three HPV genotype classified not as high-risk (69, 71 and 74).

ABBREVIATIONS:

HPV	human papillomavirus
95%CI	95% confidence interval
OR	odds ratio

AUTHOR CONTRIBUTIONS**ACKNOWLEDGMENTS****CONFLICTS OF INTEREST****FUNDING**

REFERENCES

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France:International Agency for Research on Cancer; 2013.
2. WHO. Comprehensive cervical cancer control. A guide to essential practice. 2nd ed. Geneva: WHO; 2014.
3. IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 100B. A Review of Human Carcinogens: Biological Agents. Human papillomaviruses. Lyon, France:International Agency for Research on Cancer; 2012. p. 255-313.
4. Nicolás-Párraga S, Alemany L, de Sanjosé S, Bosch FX, Bravo IG; RIS HPV TT and HPV VVAP study groups. Differential HPV16 variant distribution in squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2017;140:2092-2100.
5. Pecorelli S, Zigliani L, Odicino F. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *Int J Gynecol Obstet*. 2009; 105:107-108.
6. Hammer A, Rositch A, Qeadan F, Gravitt PE, Blaakaer J. Age-specific prevalence of HPV16/18 genotypes in cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2016;138:2795-2803.
7. Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, Kisseljov F, Dürst M, Schneider A, von Knebel Doeberitz M. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res*. 2008; 68:307-313.

8. Tjalma WA, Trinh XB, Rosenlund M, Makar AP, Kridelka F, Rosillon D, Van Dam PA, Collas S, De Souza, Holl K, Simon P, Jenkins D. A cross-sectional, multicentre, epidemiological study on human papillomavirus (HPV) type distribution in adult women diagnosed with invasive cervical cancer in Belgium. *Facts Views Vis Obgyn*. 2015; 7: 101-108.
9. De Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, Tous S, Felix A, Bravo LE, Shin HR, Vallejos CS, de Ruiz PA, Lima MA, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide survey. *Lancet Oncol*. 2010; 11: 1048-1056.
10. Wheeler CM, Hunt WC, Joste NE, Key CR, Quint WG, Castle PE. Human papillomavirus genotype distributions: implications for vaccination and cancer screening in the United States. *J Natl Cancer Inst*. 2009; 101:475-487.
11. Stoler MH, Wright TC Jr, Cuzick J, Dockter J, Reid JL, Getman D, Giachetti C. APTIMA HPV assay performance in women with atypical squamous cells of undetermined significance cytology results. *Am J Obstet Gynecol*. 2013; 208:144.e1-8.
12. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J, Garcia FA, Moriarty AT, Waxman AG, Wilbur DC, Wentzensen N, Downs LS Jr, Spitzer M, et al; ACS-ASCCP-ASCP Cervical Cancer Guideline Committee. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *CA Cancer J Clin*. 2012; 62:147-172.

13. Rositch AF, Nowak RG, Gravitt PE. Increased age and race-specific incidence of cervical cancer after correction for hysterectomy prevalence in the United States from 2000 to 2009. *Cancer*. 2014;120:2032-2038.
14. Ruengkachorn I, Hanamornroongruang S, Leelaphatanadit C, Sangkarat S. Does microinvasive adenocarcinoma of cervix have poorer treatment outcomes than microinvasive squamous cell carcinoma? *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17:4013-4017.
15. de Oliveira CM, Fregnani JH, Carvalho JP, Longatto-Filho A, Levi JE. Human papillomavirus genotypes distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil. *BMC Cancer*. 2013; 13: 357.
16. Zheng B, Li Z, Griffith CC, Yan S, Chen C, Ding X, Liang X, Yang H, Zhao C. Prior high-risk HPV testing and Pap test results for 427 invasive cervical cancers in China's largest CAP-certified laboratory. *Cancer Cytopathol*. 2015;123:428-434.
17. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer*. 2011; 128: 927-935.
18. Castellsagué X, Díaz M, De Sanjosé S, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, Peeling RW, Ashley R, Smith JS, Snijders PJ, Meijer CJ, Bosch FX; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst*. 2006; 98:303-315.

19. Rabelo-Santos SH, Derchain SF, Villa LL, Costa MC, Sarian LO, do Amaral Westin MC, Kornegay J, Zeferino LC. Human papillomavirus-specific genotypes in cervical lesions of women referred for smears with atypical glandular cells or adenocarcinoma in situ. *Int J Gynecol Pathol*. 2009; 28:272-278.
20. Serrano B, Alemany L, Tous S, Bruni L, Clifford GM, Weiss T, Bosch FX, de Sanjosé S. Potential impact of a nine-valent vaccine in human papillomavirus related cervical disease. *Infect Agent Cancer*. 2012; 7:38.
21. Fujiwara H, Yokota H, Monk B, Treilleux I, Devouassoux-Shisheboran M, Davis A, Kim JW, Mahner S, Stany M, Pignata S, Ray-Coquard I, Fujiwara K. Gynecologic Cancer InterGroup (GCIG) consensus review for cervical adenocarcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2014; 24:S96-S101.
22. Capote Negrin LG. Epidemiology of cervical cancer in Latin America. *Ecancermedicallscience*. 2015; 9:577.
23. Herrero R, Castle PE, Schiffman M, Bratti MC, Hildesheim A, Morales J, Alfaro M, Sherman ME, Wacholder S, Chen S, Rodriguez AC, Burk RD. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis*. 2005; 191:1796-1807.
24. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61:69-90.
25. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. Tumors of the uterine cervix. In: *WHO Classification of Tumors of Female Reproductive Organs*. 4th ed. Geneva: WHO; 2014. p. 267.

Table 1: Distribution of mean age according to histological type in cases of cervical cancer in patients receiving care at the Araújo Jorge Hospital, Goiânia, Goiás, Brazil, 2006-2010.

Histological type	Adenocarcinoma	Squamous cell carcinoma
Number of cases	22	84
Mean age	46.0	53.9
Standard Deviation	12.7	15.2
95% Confidence Interval	40.7 - 51.3	49.7 - 56.2
ANOVA (P-value)	0.04	

Table 2: Distribution of HPV genotypes in cases of cervical cancer in patients receiving care at the Araújo Jorge Hospital, Goiânia, Goiás, Brazil, 2006-2010.

HPV genotype	Squamous cell carcinoma		Adenocarcinoma		Total	
	n	%	n	%	n	%
16	51	60.7%	9	41.0%	60	56.6%
16/18	3	3.6%	1	4.6%	4	3.8%
16/others	8	9.5%	3	13.6%	11	10.5%
18	5	5.9%	3	13.6%	8	7.5%
31	2	2.4%	-	0.0%	2	1.9%
33	6	7.1%	-	0.0%	6	5.7%
35	1	1.2%	-	0.0%	1	0.9%
39/6	1	1.2%	-	0.0%	1	0.9%
45	1	1.2%	3	13.6%	4	3.8%
52	2	2.4%	-	0.0%	2	1.9%
53	2	2.4%	-	0.0%	2	1.9%
56	1	1.2%	-	0.0%	1	0.9%
58	1	1.2%	-	0.0%	1	0.9%
Negative	-	0.0%	3	13.6%	3	2.8%
Total	84	100.0%	22	100.0%	106	100.0%

Table 3: Association between HPV genotype and histological type of cervical cancer in patients receiving care at the Araújo Jorge Hospital, Goiânia, Goiás, Brazil, 2006-2010.

Genotypes	Squamous cell carcinoma	Adeno-carcinoma	OR	IC95%	p
HPV16	51	9	5.66	1.49 - 21.54	0.006
HPV18/45	6	6			
HPV16/18/45	53	16	0.76	0.19 - 3.02	0.47
Others/negative	13	3			

Odds ratio = OR; 95% Confidence Interval= IC95%; *P-value*= p.

Table 4: Association between age group, histological type, and HPV infection at the time of diagnosis of cervical cancer in patients receiving care at the Araújo Jorge Hospital, Goiânia, Goiás, Brazil, 2006-2010.

Diagnosis	<50 years	≥50 years	OR	IC95%	p
Adenocarcinoma	17	5	4.31	11.45-12.80	0.007
Squamous cell carcinoma	37	47			
HPV16/18/45	46	41	1.22	0.48-3.07	0.81
Other HPV types	11	2			
HPV 18/45	10	2	5.41	1.11-26.42	0.02
HPV16	36	39			

Odds ratio = OR; 95% Confidence Interval= IC95%; *P-value*= p.

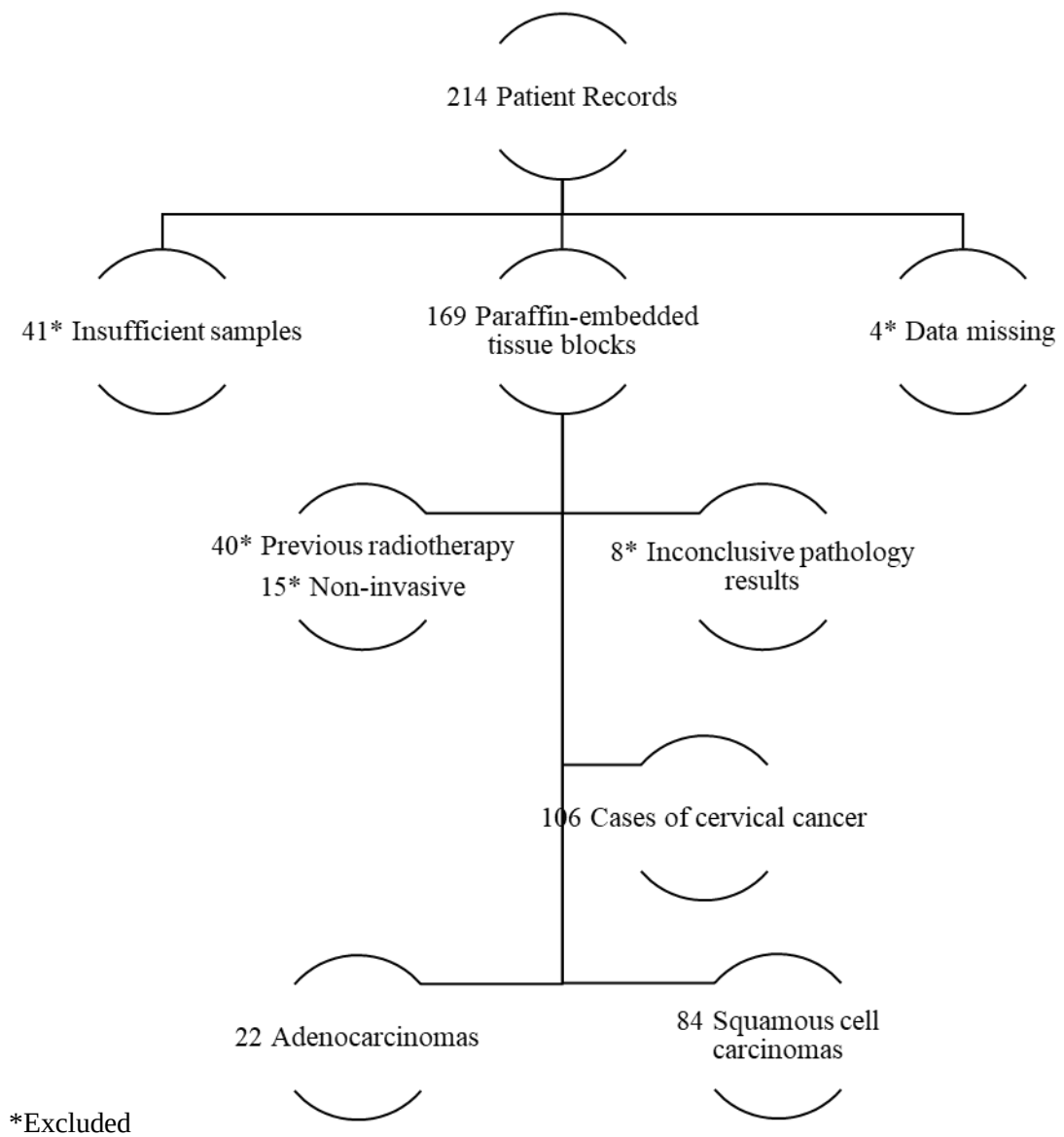
Table 5: Association between cervical cancer stages and age group in patients receiving care at the Araújo Jorge Hospital, Goiânia, Goiás, Brazil, 2006-2010.

	Stage III / IV	Stage I / II	OR	IC 95%	p
<i>Cervical Cancer</i>					
≥50 years	22	30	4.87	1.87-12.94	0.0009
<50 years	7	47			
<i>Squamous cell carcinoma</i>					
≥50 years	19	28	7.60	1.59-15.58	0.001
<50 years	3	34			
<i>Adenocarcinoma</i>					
≥50 years	3	2	4.87	0.83-7.79	0.27
<50 years	4	13			
Odds ratio = OR; 95% Confidence Interval= IC95%; <i>P-value</i> = p.					

Figure Legend:

Figure 1. Flowchart of cervical cancer cases in patients receiving care at the Araújo Jorge Hospital, Goiânia, Goiás, Brazil, 2006-2010.

Figure 1.



Artigo 2 - **Cervical cancer: an analysis of the methylation frequency of inhibitors Wnt signalling pathway**

Kelly Deyse Segati^{1¶}, Vera Aparecida Saddi^{2¶}, Megmar Aparecida dos Santos Carneiro¹, Rosane Ribeiro Figueiredo Alves³, Keila Patrícia Almeida de Carvalho¹, Luciana Ximenes Salustiano⁴, Lara Termini⁵, Walmirton Bezerra D'Alessandro⁶, Luiz Carlos Zeferino⁷, Luisa Lina Villa^{5,8}, Silvia Helena Rabelo-Santos^{1,6*¶} on behalf of Institute of Tropical Pathology and Public Health[^]

¹Institute of Tropical Pathology and Public Health, Universidade Federal de Goiás; Goiânia, GO, Brazil.

²Program in Environmental Sciences and Health, Pontifícia Universidade Católica de Goiás; Laboratory of Oncogenetics and Radiology, Associação de Combate ao Câncer; Goiânia, GO, Brazil.

³Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medical Sciences, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

⁴Department of pathological anatomy, Hospital Araújo Jorge/Associação de Combate ao Câncer em Goiás; Goiânia, GO, Brazil.

⁵Center for Translational Investigation in Oncology, ICESP - Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, School of Medicine, Universidade de São Paulo; São Paulo, SP, Brazil.

⁶School of Pharmacy, Universidade Federal de Goiás; Goiânia, GO, Brazil.

⁷Department of Obstetrics and Gynecology, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); Campinas, SP, Brazil.

⁸Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia das Doenças Associadas ao Papilomavírus, Santa Casa Research Institute, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; São Paulo, SP, Brazil.

* Corresponding author

E-mail: shrabelo@ufg.br (SHRS)

¶These authors contributed equally to this work.

Abstract

Almost all cervical cancer is caused by persistent infection with high-risk human papillomavirus (HR-HPV). Genetic and epigenetic changes as the silencing of inhibitors of WNT signalling pathway can affect the outcome of HR-HPV infection. Considering the methylation of DNA is important for the carcinogenic process, this study aimed to analyze status of methylation of genes promoters *DKK3*, *SOX17* and *SFRP2* regarding HR-HPV types 16/18/45, staging, degree of differentiation and origin of cervical cancer. A total of 106 paraffin-embedded tissue blocks from biopsies performed in cervical cancer patients were selected. HPV detection and genotyping were performed using the INNO-LiPA HPV Genotyping assay (Innogenetics®). After the treatment with sodium bisulfite, the samples were submitted to M-PCR. Methylation of genes promoters was a prevalent event in cervical cancer ranging from 65.5% to 90.9%. The prevalence of HPV 16, 18 and 45 was 82.2%. Infection with HR-HPV showed a significant association for *SFRP2* ($p=0.05$). Methylation of the *SOX17* gene promoters was positively associated with lower severity of stages of cervical cancer ($p=0.04$). Methylation of the *SOX17* gene promoters was associated with the presence of well or moderately differentiated tumors ($p=0.01$). When all genes were considered an association with better differentiation they were observed ($p=0.05$). Moreover, there was a significant association between infection by the HPV 16, 18 and 45 and the diagnosis of adenocarcinoma ($p=0.01$). The methylation of inhibitors of the WNT signalling pathway and HPV 16, 18 and 45 infections are frequent event during multistep carcinogenesis, however, it was only significant association with *SFRP2* methylation. *SOX17* methylation was related with lower cervical cancer severity but was not with HPV types. Adenocarcinomas presented a significant association

with HPV 16, 18 and 45 infections, besides it demonstrated a borderline association with *DKK3* and *SOX17* methylation.

Key word: HPV; Cervical Cancer; DNA Methylation; *DKK3*; *SOX17*; *SFRP2*.

Introduction

Almost all cervical cancer is caused by persistent infection with high-risk human papillomavirus (HR-HPV) [1]. According to their prevalence in cervical cancer, 13 HPV types (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 66), they are classified as high-risk and 8 (HPV 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 and 82) as probable or possible high-risk [2].

A multicentric study has shown HPV types 16, 18, and 45 were the three most common types in each histological group (squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and adenosquamous cell carcinoma. Together, they were accounted for 75% cases of squamous cell carcinoma and 94% of adenocarcinoma [3].

HR-HPV infection is a prerequisite for carcinogenesis, but it is not sufficient. Genetic and epigenetic changes in the host and/or viral genome can affect the outcome of HR-HPV infection [4]. DNA methylation plays a crucial role for activating and silencing genes during normal development; therefore, its disruption contributes to carcinogenesis [5]. DNA methylation changes have been shown accumulate during conditions of disease severity and have been identified in precursor and malignant cervical samples [6].

Wnt signaling pathway might be implicated in the multistep progression of HPV immortalized keratinocytes towards malignancy [7]. This pathway is a complex network of proteins involved in cell differentiation, proliferation, migration, and cell polarity, processes a real so important during embryonic development, tissue regeneration, stem cell maintenance, and homeostasis [6,8,9].

Wnt signaling inhibitor *Dickkopf-3* (*DKK3*) is functionally inactivated by promoter methylation, some studies indicate that hypermethylation were

significant higher in the cervical malignancy tissue [10-11]. Member of the SOX family SRY (Sex Determining Region Y) - Box 17 (*SOX17*), is conserved in many species as a transcription factor and participates in numerous cell development processes and biological activities. Some studies have shown *SOX17* might also play a role in human carcinogenesis [10, 12]. Secreted frizzled-related proteins (*SFRPs*) are extracellular signaling molecules that antagonize the oncogenic Wnt signaling pathway. Promoter methylation of *SFRP2* gene was frequently methylated in cervical cancer [10].

Considering the methylation of these of genes promoters and their relation with specific types of HPV may be important in cervical carcinogenesis. In this way, the main objective of this study was to analyze status of methylation of genes promoters *DKK3*, *SOX17* and *SFRP2* regarding HR-HPV types 16/18/45, staging, degree of differentiation and origin of cervical cancer.

Materials and Methods

It was a cross-sectional research involving 214 cases of women with cervical cancer divided into two groups, the first group consisting of women with a histological diagnosis of squamous cell carcinoma and the second group of women with a diagnosis of adenocarcinoma. These cases were identified from the records of the Pathology Department of the Araújo Jorge Hospital in Goiânia, Goiás, Brazil, between the year 2006 and 2010. The institutional review board approved the study protocol 867.330.

An active search for cases with already defined histopathology diagnoses was conducted using the database at the Pathology Department of the Araújo Jorge Hospital. Hematoxylin-eosin stained slides were reviewed and the cases were then selected according to the histological diagnosis obtained. The paraffin

blocks corresponding to those slides were separated to perform further testing using molecular techniques.

The flowchart depicted in Figure 1 illustrates the procedure for the selection of cases. Forty-one cases were excluded because the histological material was insufficient to enable analyses to be performed, and four cases due to missing data and fifteen because diagnosis was of a non-invasive lesion. In such a way, a total of 154 paraffin-embedded tissue blocks were selected. At this stage, a further check was performed and another 48 samples were excluded. Therefore, the total of 48 samples excluded, 40 because the patient had been submitted to radiotherapy previously and 8 because the pathology results were inconclusive. In conclusion, the final group was consisted by 106 cases of invasive cervical cancer: 84 cases of squamous cell carcinoma and 22 cases of adenocarcinoma (Fig 1).

Fig 1. Flowchart of cervical cancer cases

Histological diagnosis.

The biopsy specimens were stained with hematoxylin and eosin, reviewed according to the World Health Organization (WHO) criteria and classified as invasive squamous cell carcinoma or invasive adenocarcinoma of the cervix [13].

Molecular analysis

Following the selection of specimens, DNA was extracted from paraffin block sections. Paraffin was removed using organic solvent, digestion was performed with proteinase K, and a purification step followed with phenol/chloroform/isoamyl alcohol. The samples were then submitted to DNA

quantification and polymerase chain reaction (PCR) using the primers for *GAPDH* to evaluate DNA quality and avoid false-negatives.

HPV detection and genotyping were performed using the INNO-LiPA HPV Genotyping Extra assay (Innogenetics NV, Ghent, Belgium), which is based on the reverse hybridization principle, designed to identify HPV genotypes by detecting specific sequences in the *L1* region of the HPV genome. These sequences were amplified and denatured using SPF10 primers (65pb), biotinylated and hybridized with specific probes fixed in parallel lines in strips of nylon membrane. The assay permits the simultaneous and independent detection of 15 high-risk HPV genotypes (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 and 82) three likely high-risk (26, 53 and 66) seven low-risk HPV genotypes (6, 11, 40, 43, 44, 54 and 70) and three HPV genotype classified not as high-risk (69, 71 and 74).

DNA extracted from cervical tumors was treated with sodium bisulfite, which promotes the deamination of unmethylated cytosines in uracils, which are replaced by thymines during the synthesis of a new DNA. The methylated cytosines (5-methylcytosines) are kept intact and remain as cytosines after the reaction of amplification. The method used to treat DNA with sodium bisulfite was EpiTect Bisulfite kit Qiagen®, following the manufacturer's recommendations.

Before conducting the methylation tests, pilot tests were done using different concentrations of the reagents from the PCR mixture and different amounts of sodium bisulfite treated DNA to ensure maximum performance of the analyzes. The samples were submitted to specific methylation PCR (M-PCR) detection of of genes promoters *DKK3*, *SOX17* and *SFRP2*. The primers sequence were used had been described in the literature (van der Meide, et al., 2012). The β -actin gene was included as a control for evaluation of sample integrity and conversion

by bisulfite. M-PCR reactions were performed using the following concentrations: 1 mM modified DNA, 0.5 μ M primer set, each 200 μ M dNTP, FastStart Taq PCR buffer 3 mM MgCl₂ and Taq DNA polymerase 1.25 U Roche Diagnostics) and sufficient milliQ water for final volume of 25 μ l. DNA of Cell lines *SiHa* and *HeLa* were used for positive control, and negative control was autoclaved milliQ water. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software program, version 5.0. The data were expressed as percentages of the total number of cases. The associations between the methylation status genes, HR-HPV, staging, differentiation degree and origin of cervical neoplasia were analyzed using a Chi-squared test and Fisher exact test, when necessary. The significance assumed was p-value <0.05.

Results

A total prevalence of HPV was 94.3%. All cases as diagnosed squamous cell carcinoma were positive for HPV among cases of adenocarcinomas, 86.4% were positive for HPV.

Regarding the genotypic distribution, HPV 16 was the most prevalent, with 70.9% which are 15 cases in multiple infections (14.3%) and 60 in simple infections (56.6%). HPV 18 was found in 12 cases, 8 in simple infections (7.5%) and in 4 cases in association with HPV16 (3.8%). The HPV 45 was detected in 5 cases, 4 of these in simple infections representing 3.8%. HPV16/18/45 was detected in 81.0% of squamous cell carcinoma and in 86.4% of adenocarcinomas cases. Others HPV types were observed in 19.0% of squamous cell carcinomas. Among the cases of adenocarcinomas all were positive for HPV16/18/45 in single or multiple infections and 13.6% were negative for HPV infection (Table1).

Table 1- Distribution of HPV genotypes in cases of cervical cancer.

HPV	Squamous cell carcinoma		Adenocarcinomas		Total	
16	51	60.7%	9	41.0%	60	56.6%
16/18	3	3.6%	1	4.6%	4	3.8%
16/others	8	9.5%	3	13.6%	11	10.5%
18	5	5.9%	3	13.6%	8	7.5%
45	1	1.2%	3	13.6%	4	3.8%
Others types	16	19.0%	-	0.0%	16	15.0%
Negative	-	0.0%	3	13.6%	3	2.8%
Total	84	100.0%	22	100.0%	106	100.0%

HPV: Human papillomavirus.

The presence of promoters methylated of *SOX17*, *DKK3* and *SFRP2* genes was analyzed in 106 cervical cancer samples including 22 samples of adenocarcinomas and 84 squamous cell carcinoma. The overall prevalence of *DKK3* methylation positivity, inhibitor of Wnt signaling pathway, was 68.9%. *SOX17*, a nuclear inhibitor of Wnt pathway, was methylated in 80.1% of cases of cervical cancer, *SFRP2* extracellular inhibitor of Wnt signaling pathway, was methylated in 73.5% of the cases. In the group of adenocarcinomas methylation of *DKK3* was observed in 65.5% of cases, *SOX17* was methylated in 90.0% and *SFRP2* was methylated in 68.1%. In the squamous cell carcinoma group the methylation of of genes promoters *SOX17*, *DKK3* and *SFRP2* were observed in 65.5%, 77.4% and 75.0%, respectively. These evidences are shown in flowchart described in figure 2 (Fig 2).

Fig 2. Distribution of methylation analyzes of genes promoters *DKK3*, *SOX17* e *SFRP2* in cases of cervical cancer. Figure Legend. *DKK3*: Dickkopf-3; *SOX17*: Sex Determining Region Y-Box17; *SFRP2*: Secreted frizzled-related proteins.

Table 2 shows the relation between the methylation of genes promoters of *DKK3*, *SOX17* and *SFRP2* and the HPV positivity. Infection with high risk HPV 16/18/45 demonstrated a significant association for *SFRP2* gene promoters methylation ($p= 0.05$). The methylation of other of genes promoters was not associated with the genotypes16/18/45, even when all the genes were considered.

Table 2 - Association between HPV16/18/45 positivity and DNA methylation in cases of cervical cancer.

	HPV16/18/45		Others HPV/HPV-		<i>p value</i>
<i>DKK3</i> +	59	80.8%	14	19.9%	0.32
<i>DKK3</i> -	28	84.9%	5	15.1%	
<i>SOX17</i> +	69	81.2%	16	18.8%	0.33
<i>SOX17</i> -	18	85.7%	3	14.3%	
<i>SFRP2</i> +	67	85.9%	11	14.1%	0.05
<i>SFRP2</i> -	20	71.4%	8	28.6%	
<i>All gene</i> +	41	82.0%	9	18.0%	0.49
-	46	82.1%	10	17.9%	

HPV: Human papillomavirus; *DKK3*: *Dickkopf-3*; *SOX17*: Sex Determining Region Y-Box17; *SFRP2*: Secreted frizzled-related proteins; All genes: *DKK3* +*SFRP2*+*SOX17* methylated.

The staging of cervical cancer of included cases ranged from Ia to IVb. Stage I was the most prevalent in all cases of invasive cancer, including squamous cell carcinoma (52.38% 44/84) and cervical adenocarcinomas (40.90% 9/22). (Data not show). Table 3 shows the relation between the presence of specific genotype of HPV and the methylation of genes promoters of *DKK3*, *SOX17* and *SFRP2*. Degree of staging III and IV was not associated with the presence of HPV 16/18/45 infection ($p = 0.40$). Methylation of gene promoters of *SOX17* presented an association with degree I and II tumor ($p = 0.04$). This association was not

observed for *DKK3* and *SFRP2*. When methylation of genes promoters of the three genes was analyzed, no statistically significant differences were observed.

Table 3 - Association between staging, HPV positivity and DNA methylation in cases of cervical cancer.

	Stage III IV		Stage I II		<i>p value</i>
HPV 16/18/45+	12	16.0%	63	84.0%	0.40
HPV 16/18/45-	5	17.9%	23	82.1%	
<i>DKK3</i> +	20	27.4%	53	72.6%	0.49
<i>DKK3</i> -	9	27.3%	24	72.7%	
<i>SOX17</i> +	20	23.5%	65	76.5%	0.04
<i>SOX17</i> -	9	42.9%	12	57.1%	
<i>SFRP2</i> +	19	24.4%	59	75.6%	0.13
<i>SFRP2</i> -	10	35.7%	18	64.3%	
<i>All gene</i> +	14	25.5%	41	74.5%	0.64
-	15	29.4%	36	70.6%	

HPV: Human papillomavirus; *DKK3*: *Dickkopf-3*; *SOX17*: Sex Determining Region Y-Box17; *SFRP2*: Secreted frizzled-related proteins; All genes: *DKK3* +*SFRP2*+*SOX17* methylated.

Degree of tumor differentiation is divided into 5 classes: GX tumor grade cannot be assessed, G1 tumor well differentiated, G2 moderately differentiated tumor, G3 poorly differentiated and G4 undifferentiated tumor. There was variation of tumor differentiation between GX and G3, no case of undifferentiated tumor was observed. Poorly differentiated tumors weren't associated with HPV infection 16/18/45 ($p=0.31$). DNA methylation analyzes of Wnt signaling pathway inhibitor genes revealed that methylation of promoters of *SOX17* gene was associated with the presence of well or moderately differentiated tumors ($p=0.01$). The association between a positive methylation promoters of three gene (*DKK3*+*SOX17*+*SFRP2*)

and well moderately differentiated tumors was also observed ($p=0.05$). These data are shown in Table 4.

Table 4 - Association between the degree of tumor differentiation, positivity for HPV and methylation in cases of cervical cancer.

	Poorly differentiated		Well/Moderately differentiated		<i>p value</i>
HPV 16/18/45+	28	37.8%	46	62.2%	0.31
HPV 16/18/45-	5	45.5%	6	54.5%	
<i>DKK3</i> +	23	37.7%	38	62.3%	0.43
<i>DKK3</i> -	10	35.7%	18	64.3%	
<i>SOX17</i> +	23	36.5%	40	63.5%	0.01
<i>SOX17</i> -	10	38.5%	16	61.5%	
<i>SFRP2</i> +	22	32.4%	46	67.6%	0.43
<i>SFRP2</i> -	11	61.1%	7	38.9%	
<i>Al gene</i> +	11	29.7%	26	70.3%	0.05
-	22	44.9%	27	55.1%	

HPV: Human papillomavirus; *DKK3*: *Dickkopf-3*; *SOX17*: Sex Determining Region Y-Box17; *SFRP2*: Secreted frizzled-related proteins; All genes: *DKK3* +*SFRP2*+*SOX17* methylated.

Table 5 shows the relation between cervical cancer staging, HPV positivity and DNA methylation in relation to the histological type. There was a significant association between infection by genotypes 16, 18 and 45 and diagnosis of adenocarcinoma ($p = 0.01$). A borderline association was observed between the methylation of genes promoters of *DKK3* and *SOX17* and the diagnosis of adenocarcinoma ($p=0.07$; $p=0.08$, respectively). Other analyzed variables did not show significant associations with the histological diagnosis.

Table 5 - Association between the histological type of cervical cancer, HPV positivity and DNA methylation.

	Adenocarcinoma		Squamous cell carcinoma		<i>p value</i>
Stage III IV	7	24.1%	22	75.9%	0.30
I II	15	19.5%	62	80.5%	
HPV 16/18/45+	19	22.0%	67	77.9%	0.01
HPV 16/18/45-	0	0.0%	17	100.0%	
<i>DKK3</i> +	18	24.7%	55	75.3%	0.07
<i>DKK3</i> -	4	12.1%	29	87.9%	
<i>SOX17</i> +	20	23.5%	65	76.5%	0.08
<i>SOX17</i> -	2	9.5%	19	90.5%	
<i>SFRP2</i> +	15	19.2%	63	80.8%	0.26
<i>SFRP2</i> -	7	25.0%	21	75.0%	
<i>All gene</i> +	12	24.0%	38	76.0%	0.22
-	10	17.9%	46	82.1%	

HPV: Human papillomavirus; *DKK3*: *Dickkopf-3*; *SOX17*: Sex Determining Region Y-Box17; *SFRP2*: Secreted frizzled-related proteins; All genes: *DKK3* +*SFRP2*+*SOX17* methylated.

Discussion

Methylation of inhibitors WNT signaling pathway and HPV 16/18/45 infections are frequent event during multistep carcinogenesis. This study presented that methylation of genes promoters was a prevalent event in cervical cancer with positivity varying between 65.5% and 90.9% of all cases included. Infection with high risk HPV 16/18/45 showed a significant association for *SFRP2*. Methylation of promoters *SOX17* gene revealed association for the lower severity of stages (I and II) of cervical cancer.

Importantly, this study also indicated that methylation of of gene promoters *SOX17* was associated with the presence of well or moderately differentiated tumors. When all genes were considered the association with better differentiation was observed. In addition, there was a significant association between infection

by genotypes 16, 18 and 45 and the diagnosis of adenocarcinoma. A borderline association was observed between the methylation of genes promoters of *DKK3* and *SOX17* genes and the diagnosis of adenocarcinoma.

Aberrant DNA methylation is considered as an important mechanism of gene regulation and it has been shown to accumulate in relation to disease severity. HPV infections along with genetic and epigenetic changes are frequently associated and essential for initiation, development and progression of the disease [6].

Methylation of genes promoters was a prevalent event in cervical cancer (*DKK3* 68.9%, *SOX17* 80.1% and *SFRP2* 73.5%). Notwithstanding, there was a slight variation between the methylation status of the genes studied and the histological type of cervical cancer. Methylation was the most prevalent event among the all cases. It has been proposed that epigenetic changes occur much earlier than the genetic change and plays an important role in the initiation, development and progression of câncer [14].

In accordance with van der Meide et al. [10] they also found the high prevalence of methylation in tissue with invasive neoplasia (*DKK3* 82.0%, *SOX17* 89.0%, *SFRP2* 84.0%). For Chung et al. [15] *SFRP2* promoter was highly hypermethylated in squamous cell carcinoma, the frequency of methylation decreased in noninvasive neoplasia and normal tissue. Although, methylation in some studies increases with the severity of the disease, this pattern is not consensual. In normal specimens occasional, methylation positivity can be observed. The *DKK3* gene showed weak signals in virtually all normal [10]. In fact, hypermethylation and gene silencing is virtually known to affect all signaling pathways independent of HPV infection involving proliferation, cell cycle

regulation, apoptosis and cell survival, DNA repair, cell-to-cell adhesion, angiogenesis, invasion and metastasis [6].

Besides to consider the methylation status, it is important to evaluate the type of HPV involved in carcinogenesis. In summary, this current study evidenced the association between infection with HR-HPV 16/18/45 and methylation of genes promoters of *SFRP2*. It also considered the two events together in cervical cancer, while other studies did not consider the relation between HR-HPV infection and the presence of gene methylation.

HPV 16 and 18 have been found in 71% of cases of cervical cancer in a retrospective worldwide survey, with genotypes 16, 18 and 45 are being found in 94% of cases of adenocarcinoma and in 75% of cases of squamous cell carcinomas [3]. Epigenetic silencing of *SFRP* genes leads to oncogenic activation of Wnt pathway and contribute to tumor progression [6]. Lin et al., [16] showed the frequency of *SFRPs* genes promoter hypermethylation in adenocarcinoma of cervix samples was 82.6% for *SFRP2*. The frequency of *SFRPs* promoter methylation in adenocarcinoma was significantly higher than in normal control samples ($P < 0.001$) [16].

A previous study by Chung et al. [15] confirmed a high DNA methylation frequency of *SFRP2* in cervical scrapings of adenocarcinomas case (83%), they found a high DNA methylation rate in squamous cells carcinoma (80.7%) using M-PCR, which is consistent with the findings of this study. These authors did not relate the methylation status with HPV types, though.

SOX17 are transcription factors in the gastrointestinal tract, was preferentially expressed in esophagus, stomach, and small intestine. No *SOX17* expression was detected in several human cancer cell lines, and no expression

was detected in primary tumors derived from various tissues. *SOX17* promoter methylation and concomitant reduced *SOX17* mRNA expression has been described in gastric, colorectal, and breast cancer [17,18,19]. Among the cases of cervical cancer methylation of *SOX17* rarely was reported [10]. Methylation of genes promoters of *SOX17* was associated for the lower severity of stages (I and II) of cervical cancer, it also showed methylation of gene promoter *SOX17* which was associated with the presence of well or moderately differentiated tumors.

Van der Meide et al. [10] found high methylation frequency of *SOX17* gene in squamous cell carcinoma (89.0%) and in adenocarcinomas (62.0%). These authors reported they were pioneers in the investigation of *SOX17* gene in cervical cancer. These findings are different from those observed in the present study, where the highest prevalence of methylation was observed among cases of adenocarcinomas (90.1%) compared to cases of squamous cell carcinomas (77.4%), a borderline was presented in association between the methylation of *SOX17* gene and the diagnosis of adenocarcinoma ($p=0.08$). The hypermethylation of CpG island associated with promoter region is an important mechanism of gene silencing and is a frequent and early event in cervical carcinogenesis [20]. In cervical cancer, inactivation of tumor suppressor gene is associated with histological grade and metastatic tumor [6].

This study found no association between the degree of tumor stage and presence of methylation of *DKK3*. On the other hand, Jiang et al. [21] observed hypermethylated of *DKK3* gene, which was associated with tumor diameters with prognostic significance in cervical cancer. It was found a borderline association between the methylation of genes promoters of *DKK3* and the diagnosis of adenocarcinoma. For van der Meide et al [10] the frequency of *DKK3* and *SFRP2*

methylation was significantly higher in adenocarcinomas compared to squamous cell carcinoma ($p=0.01$). WNT/ β -catenin signaling pathway are frequently affected by promoter methylation in cervical cancer, with *DKK3* and *SFRP2* promoter methylation being most specifically associated with the development of adenocarcinomas[10]. Unlike the findings of van der Meide et al. [10] this study did not find association between the methylation of gene promoters of *SFRP2* and the diagnosis of adenocarcinomas.

The presence of infection of HR-HPV was high, particularly, when there was infection by HPV 16, 18 and 45 (82.2%). There was a significant association between infection by genotypes 16, 18 and 45 and the diagnosis of adenocarcinoma. Others authors also found the high prevalence, van der Meide et al. [10] reported that all scrapings of women with adenocarcinomas tested were HPV16 or 18 positive. HR-HPV-positive women especially those testing HPV16, 18 or 45 positive, there is an increased risk of adenocarcinomas [3,22,23].

In conclusion, WNT signaling pathway is involved in cervical carcinogenesis through epigenetic events such as DNA methylation. The association with infection by specific types of HPV was only significant for one of the analyzed the gene promoters (*SFRP2*). In view of current discussions in this study methylation of gene promoters *SOX17* did not indicate neoplasia of greater severity. Adenocarcinomas are associated with HPV16/18/45 and are probably associated with the methylation of the genes promoters *SOX17* and *DKK3*.

Acknowledgments

Reference

1. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2017. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2017. Last accessed January 13, 2017.
2. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Human papillomaviruses. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 100 (Pt B), 255-313, 2012. Last accessed February 27, 2017.
3. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: A retrospective cross-sectional survey. *Lancet Oncol.* 2010; 11, 1048–1056.
4. Vasiljevic N, Scibior-Bentkowska D, Brentnall ACadman L, Austin J, Szarewski A, et al. Credentialing of DNA methylation assays for human genes as diagnostic biomarkers of cervical intraepithelial neoplasia in high-risk HPV positive women. *Gynecol Oncol.* 2014; vol. 132, (3) 709-714. 10.1016/j.ygyno.2014.02.001.
5. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 2010; 28:1057–68.
6. Bhat S, Kabekkodu SP, Noronha A, Satyamoorthy K. Biological implications and therapeutic significance of DNA methylation regulated genes in cervical cancer. *Biochimie.* 2016 Feb; 121:298-311.doi: 10.1016/j.biochi.2015.12.018.
7. Uren A, Fallen S, Yuan H, Usubutun A, Kucukali T, Schlegel R, et al. Activation of the canonical Wnt pathway during genital keratinocyte transformation: a model for cervical cancer progression, *Cancer Res.* 2005; (65) 6199–6206.
8. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012; (13)767–779.

9. Ramos-Solano M, Meza-Canales ID, Torres-Reyes LA, Alvarez-Zavala M, Alvarado-Ruiz L, et al. Expression of WNT genes in cervical cancer derived cells: Implication of WNT7A in cell proliferation and migration. *Exp Cell Res*. 2015; 335: 39-50.
10. van der Meide WF, Snellenberg S, Meijer CJLM, Baalbergen A, Helmerhorst TJM. Promoter methylation analysis of WNT/ β -catenin signaling pathway regulators to detect adenocarcinoma or its precursor lesion of the cervix. *Gynecol Oncol*. 2011; 123(1):116-22.
11. Kang WS, Cho SB, Park JS, Lee MY, Myung SC, Kim WY, et al. Clinico-epigenetic combination including quantitative methylation value of *DKK3* augments survival prediction of the patient with cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013; 139:97–106 DOI 10.1007/s00432-012-1262-7.
12. Ye YW, Wu JH, Wang CM, Zhou Y, Du CY, Zheng BQ, et al. Sox17 regulates proliferation and cell cycle during gastric cancer progression. *Cancer Lett*. 2011; Aug 28;307(2):124-31. doi: 10.1016/j.canlet.2011.03.024. Epub 2011 Apr 22.
13. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. Tumors of the uterine cervix. In: WHO Classification of Tumors of Female Reproductive Organs. 4th ed. Geneva: WHO; 2014. p. 267.
14. Jones PA, Baylin SB, The fundamental role of epigenetic events in cancer, *Nat. Rev. Genet*. 2002; (3) 415e428.
15. Chung MT, Sytwu HK, Yan MD, Shih YL, Chang CC, Yu MH, et al. Promoter methylation of SFRPs gene family in cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2009;112(2):301–6

16. Lin YW¹, Chung MT, Lai HC, De Yan M, Shih YL, Chang CC, Yu MH. Methylation analysis of SFRP genes family in cervical adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009; 135(12):1665-74. doi: 10.1007/s00432-009-0613-5. Epub 2009 Jun 10.
17. Zhang W, Glockner SC, Guo M, Machida EO, Wang DH, Easwaran H, et al. Epigenetic inactivation of the canonical Wnt antagonist *SRY-box containing gene 17* in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2008, 68:2764–72.
18. Du YC, Oshima H, Oguma K, Kitamura T, Itadani H, Fujimura T, et al. Induction and down-regulation of *Sox17* and its possible roles during the course of gastrointestinal tumorigenesis. *Gastroenterology*. 2009; 137:1346–57.
19. Fu DY, Wang ZM, Li C, Wang BL, Shen ZZ, Huang W, et al. *Sox17*, the canonical Wnt antagonist, is epigenetically inactivated by promoter methylation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 119:601–12.
20. Yang, HJ. Aberrant DNA methylation in cervical carcinogenesis, *Chin. J. Cancer*. 2012; (32) 42-48.
21. Jiang T, Huang L, Wang S, Zhang S. Clinical significance of serum *Dkk3* in patients with gynecological cancer, *J Obstet Gynaecol Res*. 2010; (36) 769-773.
22. Rabelo-Santos SH, Derchain SF, Villa LL, Costa MC, Sarian LO, do Amaral Westin MC, et al. Human papillomavirus-specific genotypes in cervical lesions of women referred for smears with atypical glandular cells or adenocarcinoma in situ. *Int J Gynecol Pathol*. 2009; 28: 272-278.
23. Kinney W, Fetterman B, Cox JT, Lorey T, Flanagan T, Castle PE. Characteristics of 44 cervical cancers diagnosed following Pap-negative, high risk HPV-positive screening in routine clinical practice. *Gynecol Oncol*. 2011; 121:309–13.

Figure1. Flowchart cases

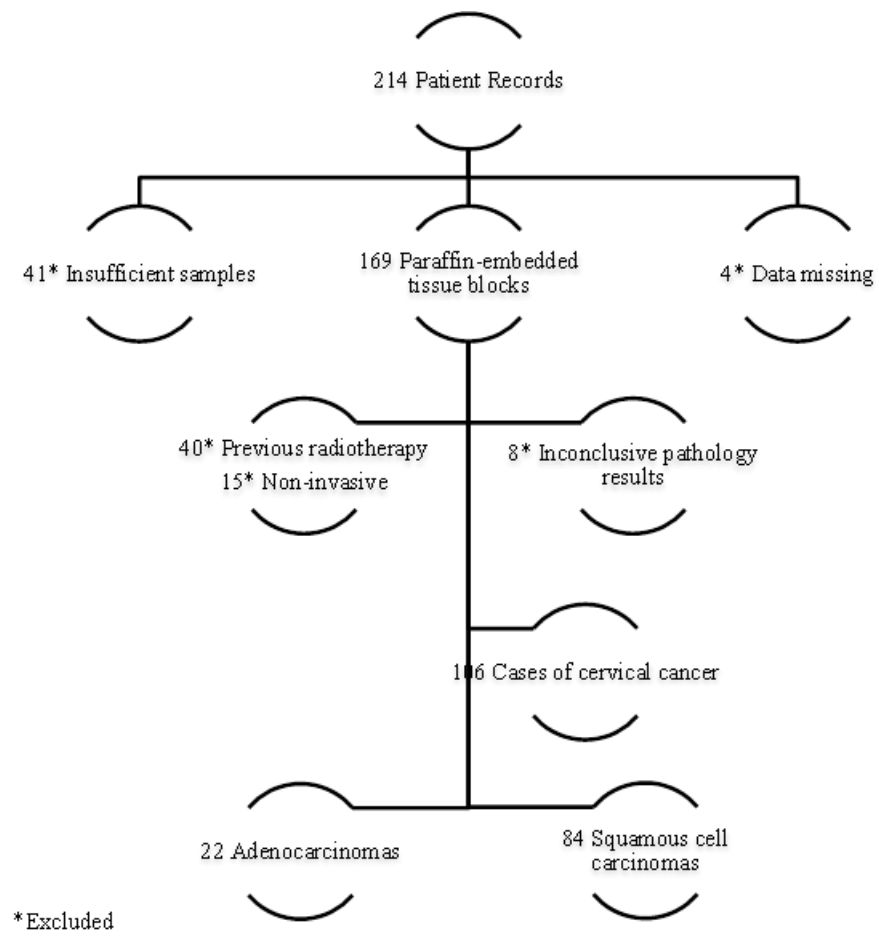
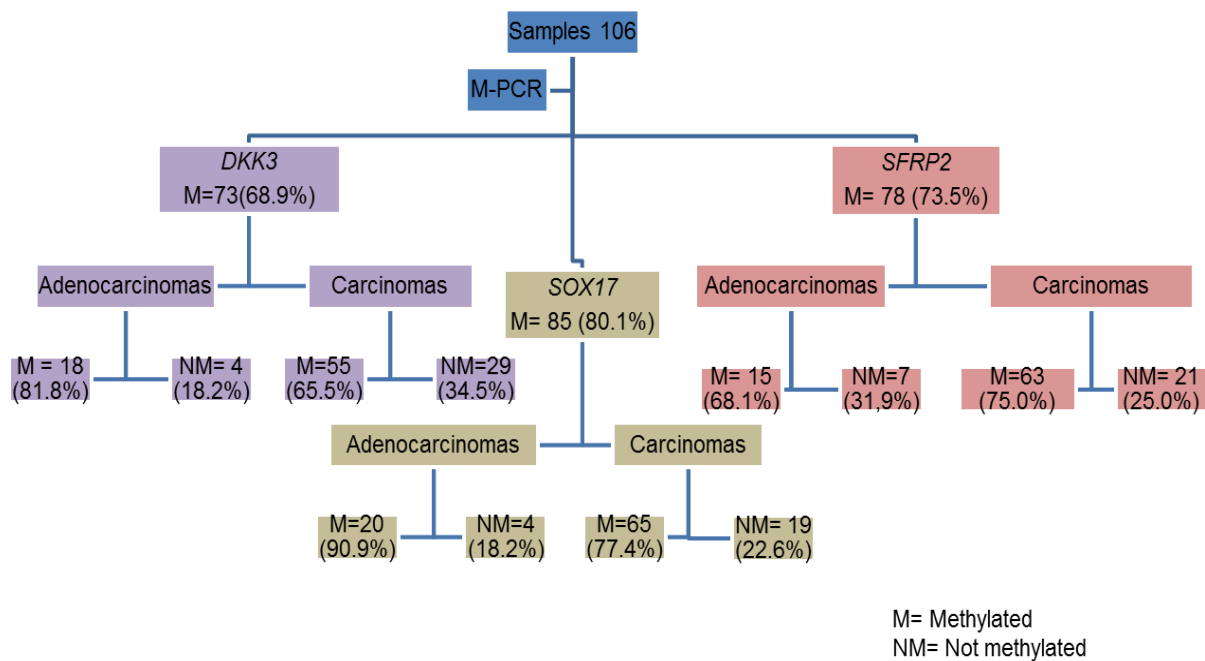


Figure 2 - Distribution of methylation analyzes of genes promoters *DKK3*, *SOX17* e *SFRP2* in cases of cervical cancer.



6 DISCUSSÃO

Os principais achados dos estudos apresentados mostraram que mulheres com diagnóstico de adenocarcinomas de colo uterino foram significativamente mais jovens quando comparadas as mulheres com diagnóstico de carcinomas de células escamosas. Os diagnósticos de adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas têm características epidemiológicas similares, contudo, adenocarcinomas diferem por estarem associados com obesidade, estrogênio exógeno e idades mais jovens (FUJIWARA ET AL., 2014). O conhecimento da distribuição do câncer de colo uterino por faixa etária é determinante para a concepção de estratégias de controle da doença (NEGRIN, 2015).

A positividade para os genótipos 18 e 45 esteve associada ao diagnóstico de adenocarcinomas em mulheres de faixa etária >50 anos. Bem como, a positividade para o genótipo 16 esteve associada ao diagnóstico de carcinoma de células escamosas. A diferença entre a idade específica e os genótipos de HPV podem ser resultado de uma progressão mais rápida das lesões precursoras que contenham os genótipos 16 e 18, comparando com as lesões precursoras positivas para outros genótipos carcinogênicos (HAMMER ET AL., 2016). De Sanjose et al. (2010) encontraram uma relação, entre a idade das mulheres e o diagnóstico câncer de colo uterino positivo para HPV 18 ou 45. Estes autores mostraram que a idade das mulheres foram significativamente menor do que a idade das mulheres com câncer do colo uterino positivas para HPV16 outros tipos de HPV de alto risco oncogênico.

A prevalência da infecção por HPV16 e HPV18 pode declinar com aumento da idade no momento do diagnóstico de câncer de colo uterino, essa variação pode ser de 74.8% em mulheres com faixa etária de 30-39 anos a 56.8% entre mulheres com idade maior que 70 anos, assim sendo esses genótipos são mais comumente encontrados em mulheres jovens (HAMMER ET AL., 2016). Serrano et al. (2012) concluíram que a contribuição relativa dos HPV 16, 18 e 45 diminui com o avanço da idade e a contribuição relativa para os genótipos 31,33,52 e 58 aumenta.

A metilação de inibidores da via de sinalização de Wnt e a presença de infecções por HPV 16/18/45 são eventos frequentes durante a carcinogênese em vários passos. A metilação aberrante do DNA é considerada um importante mecanismo de regulação de genes e tem se mostrado prevalente com o aumento da gravidade da doença. As infecções por HPV juntamente com alterações genéticas e epigenéticas são frequentemente

associadas e essenciais para a iniciação, desenvolvimento e progressão do câncer de colo uterino (BHAT ET AL., 2016).

A presença de infecção por HPV 16, 18 e 45 mostraram uma associação positiva para o diagnóstico de adenocarcinomas, uma vez que esses genótipos foram comparados a outros genótipos de alto risco oncogênicos. Observou-se associação limítrofe entre a metilação dos genes *DKK3* e *SOX17* e o diagnóstico de adenocarcinomas. Esse evento pode ser parcialmente explicado pelo fato de que os genótipos 16 e 18 mais comumente estejam integrados ao genoma do hospedeiro, enquanto os outros genótipos de alto risco oncogênico podem apresentar-se com maior frequência na forma episomal (HAMMER ET AL., 2016).

Os resultados obtidos no presente contribuem para o melhor entendimento da carcinogênese do colo uterino através de eventos como a metilação do DNA do hospedeiro bem como sobre a distribuição de genótipos de HPV, os tipo histopatológicos, o grau de estadiamento e de diferenciação, a idade das pacientes com diagnóstico de câncer de colo uterino na Região Centro-Oeste do Brasil.

7 CONCLUSÕES

Os genótipos 16,18, 33 e 45 estão frequentemente envolvidos na carcinogênese do colo uterino no Brasil.

A presença da infecção por HPV 16 esteve mais associada ao diagnóstico de carcinoma de células escamosas, bem como os genótipos 18 e 45 estiveram associados ao diagnóstico de adenocarcinomas.

A idade inferior a 50 esteve relacionada ao diagnóstico de adenocarcinoma, a mesma faixa etária apresentou associação positiva para infecção por HPV18 e 45 comparado ao HPV16.

A associação com a infecção por tipos específicos de HPV (16, 18 e 45) foi significativa apenas para um dos genes analisados (*SFRP2*).

No estudo metilação da região promotora do gene *SOX17* não indicou neoplasia invasiva de maior gravidade.

Os adenocarcinomas estão associados a infecção por HPV 16, 18 e 45.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. *Biologia molecular da célula. Câncer*. 2010. Porto Alegre: Artes Médicas, Capítulo 20; 1213 p.
- American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2017. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2017. Available onlineExit Disclaimer. Last accessed January 13, 2017.
- BERNARD H. U., BURK R. D., CHEN Z., VAN DOORSLAER K., HAUSEN H., DE VILLIERS E. M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401, 70–79 10.1016/j.virol.2010.02.002
- BHAT S, KABEKKODU SP, NORONHA A, SATYAMOORTHY K. Biological implications and therapeutic significance of DNA methylation regulated genes in cervical cancer. *Biochimie*. 2016 Feb;121:298-311. doi: 10.1016/j.biochi.2015.12.018.
- BOERS A, WANG R, VAN LEEUWEN RW, KLIP HG, DE BOCK GH, HOLLEMA H, VAN CRIEKINGE W, DE MEYER T, DENIL S, VAN DER ZEE AG, SCHUURING E, WISMAN GB. Discovery of new methylation markers to improve screening for cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3. *Clin Epigenetics*. 2016 9;8:29. doi: 10.1186/s13148-016-0196-3.
- BRAVO, I. G.; FELEZ-SANCHEZ, M. Papillomaviruses: viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evolution, Medicine, and Public Health*, p. 32–51, 2015.
- CHUNG MT, LAI HC, SYTWU HK, YAN MD, SHIH YL, CHANG CC, YU MH, LIU HS, CHU DW, LIN YW: SFRP1 and SFRP2 suppress the transformation and invasion abilities of cervical cancer cells through Wnt signal pathway. *Gynecol Oncol* 2009, 112:646-653.
- CHUNG MT, SYTWU HK, YAN MD, SHIH YL, CHANG CC, YU MH, CHU TY, LAI HC, LIN YW: Promoter methylation of SFRPs gene family in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2009, 112:301-306.
- CLEVERS H, NUSSE R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*. 2012 Jun 8;149(6):1192-205. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.012.

- de VILLIERS, FAUQUET C, BROKER TR, BERNARD HU, ZUR HAUSEN H. Classification of papillomaviruses. *Virology*, v. 324, n. 1, p. 17-27, June 2004.
- DENNY L, DE SANJOSE S, MUTEBI M, ANDERSON BO, KIM J, JERONIMO J, HERRERO R, YEATES K, GINSBURG O, SANKARANARAYANAN R. Interventions to close the divide for women with breast and cervical cancer between low-income and middle-income countries and high-income countries. *Lancet*. 2017 25;389(10071):861-870. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31795-0.
- FERNANDES JR AS, LIMA AAPR, LIMA EM, HORTA HL, COUTINHO LFP, SALLUM LFTA, DERCHAIN SFM, SARIAN LOZ, SIMÕES R. Câncer do Colo Uterino: Tratamento – Diretrizes-AMB.2011. Disponível em: http://diretrizes.amb.org.br/ans/cancer_do_colo_uterino-tratamento.pdf
- FU DY, WANG ZM, LI C, WANG BL, SHEN ZZ, HUANG W, et al. Sox17, the canonical Wnt antagonist, is epigenetically inactivated by promoter methylation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 119:601–12.
- GENE BANK, 2017. Accessed in 16/04/2017: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene.
- GLOBOCAN, 2012. Estimated Cancer incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.
- HAMMER A, ROSITCH A, QEADAN F, GRAVITT PE, BLAAKAER J. Age-specific prevalence of HPV16/18 genotypes in cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2016; 138: 2795-2803.
- HANSEL A, STEINBACH D, GREINKE C, et al. A promising DNA methylation signature for the triage of high-risk human papillomavirus DNA-positive women. *PLoS One* 2014;9:e91905.
- HATTORI N & USHIJIMA T. Epigenetic impact of infection on carcinogenesis: mechanisms and applications *Genome Med*. 2016; 8: 10. doi: 10.1186/s13073-016-0267-2.
- HO CM, CHIEN TY, HUANG SH, WU CJ, SHIH BY, CHANG SC. Multivariate analysis of the prognostic factors and outcomes in early cervical cancer patients undergoing radical hysterectomy. *Gynecol Oncol* 2004;93:458-64.
- IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 100B: A Review of Human Carcinogens: Biological Agents, (2012).

- IARC. IARC Handbook of Cancer Prevention. Chapter 1 Cervical cancer and screening Volume 10. 2005 p (08-10).
- JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, FERLAY J, WARD E, FORMAN D. Global cancer statistics. *Cancer J Clin* 2011; 61(2):69-90.
- KANG WS, CHO SB, PARK JC, LEE MY, MYUNG SC, KIM WY, LEE SH, KIM DG, LEE EJ. Clinico-epigenetic combination including quantitative methylation value of DKK3 augments survival prediction of the patient with cervical cancer *J Cancer Res Clin Oncol* (2013) 139:97–106.
- KURMAN, RJ, NORRIS, HJ, WILKINSON, EJ. Atlas of tumor pathology: tumors of the cervix, vagina, and vulva. Eight series. Washington, DC. Armed Forces Institute of Pathology; 2014.
- MORGAN HD, DEAN W, COKER HA, REIK W, PETERSEN-MAHRT SK. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem* 2004; 279, 52353–52360.
- NAKAGAWA, J. T.; ESPINOSA, M. M.; BARBIERI, M.; SCHIRMER, J. Fatores associados ao câncer invasivo do colo do útero no estado de mato grosso. *Ciência, Cuidado e Saúde*, v. 9, n. 4, p. 631–637, 2011.
- NICOLÁS-PÁRRAGA S, ALEMANY L, DE SANJOSÉ S, BOSCH FX, BRAVO IG. RIS HPV TT and HPV VVAP study groups. Differential HPV16 variant distribution in squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2017; 140: 2092-2100.
- OMIM ENTRY. Description SRY-RELATED HMG-BOX GENE 17. 2017. Disponível em: <http://www.omim.org/entry/610928#description>.
- PARVEEN N, HUSSAIN MU, PANDITH AA, MUDASSAR S. Diversity of axin in signaling pathways and its relation to colorectal cancer. *Med Oncol*. 2011 Dec;28 Suppl 1:S259-67. doi: 10.1007/s12032-010-9722-x. Epub 2010 Oct 30. Review.
- PASSAMONTI, B., GUSTINUCCI, D., GIORGI, R.P., CESARINI, E., BULLETTI, S., CARLANI, A., et al., 2016, Sep. Cervical human papilloma virus (HPV) DNA primary screening test: results of a population-based screening programme in central Italy. *J. Med. Screen*. 10.

- PECORELLI S, ZIGLIANI L, ODICINO F. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *Int J Gynecol Obstet*. 2009; 105:107 -8.
- PORTELA A, ESTELLER M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010; 28:1057–68.
- RAMOS-SOLANO M, MEZA-CANALES ID, TORRES-REYES LA, ALVAREZ-ZAVALA M, ALVARADO-RUÍZ L, RINCON-OROZCO B, GARCIA-CHAGOLLAN M, OCHOA-HERNÁNDEZ AB, ORTIZ-LAZARENO PC, RÖSL F, GARIGLIO P, JAVE-SUÁREZ LF, AGUILAR-LEMARROY A. Expression of WNT genes in cervical cancer-derived cells: Implication of WNT7A in cell proliferation and migration. *Exp Cell Res*. 2015 1;335(1):39-50. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.05.001.
- SAAVEDRA KP, BREBI PM, ROA JC. Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. *Clin Epigenetics* 2012; 31 4(1):13.
- SALES, L. K. O. Estudo da sobrevida e fatores prognósticos em mulheres com câncer do colo do útero no Rio Grande do Norte, Brasil. Dissertação de mestrado. Mossoró, RN, 2015. Disponível em: <http://www.uern.br/controladepaginas/ppgss-alunos-regulares-2013>. Acesso em 27 de agosto de 2016.
- SCHIFFMAN M, BURK RD, BOYLE S, RAINE-BENNETT T, KATKI HA, GAGE JC, et al. A study of genotyping for management of human papillomavirus-positive, cytology-negative cervical screening results. *J Clin Microbiol*. 2015 53(1):52-9. doi: 10.1128/JCM.02116-14.
- SILVA-FILHO AL. Use of the prognosis markers in the treatment for the invasive cervical carcinoma. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2009; 31(9):468-73.
- STOLER MH, WRIGHT TC JR, CUZICK J, DOCKTER J, REID JL, GETMAN D, GIACHETTI C. APTIMA HPV assay performance in women with atypical squamous cells of undetermined significance cytology results. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 5(12) 02198-9.
- TOTA, J., BENTLEY, J., BLAKE, J., COUTLEE, F., DUGGAN, M., FERENCZY, A., et al., 2017. Introduction of molecular HPV testing as the primary technology in cervical cancer screening: acting on evidence to change the current paradigm. *Prev. Med.* 98, 5–14.
- VAN DER MEIDE WF, SNELLENBERG S, MEIJER CJLM, BAALBERGEN A, HELMERHORST TJM. Promoter methylation analysis of WNT/β-catenin

signaling pathway regulators to detect adenocarcinoma or its precursor lesion of the cervix. *Gynecol Oncol*. 2011; 123(1):116-22.

- VASILJEVIC N, SCIBIOR-BENTKOWSKA D, BRETNALL A et al. (2014). Credentialing of DNA methylation assays for human genes as diagnostic biomarkers of cervical intraepithelial neoplasia in high-risk HPV positive women. *Gynecol Oncol* vol. 132, (3) 709-714. 10.1016/j.ygyno.2014.02.001.
- VINKUROVA S, WENTZESEN N, KRAUS I, KLAES R, DRIESCH C, MELSHEIMER P, KISSELJOV F, DÜRST M, SCHNEIDER A, VON KNEBEL DOEBERITZ M. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res* 2008; 68:307–18.
- WEI B, GUO Y, ZHAI J, SU J, HAN L, KANG C, ZHANG Q. A study of the relationship between the Wnt/ β -catenin signaling pathway and the gastrointestinal development of rat embryonic and perinatal periods. *Exp Ther Med*. 2013 Jun;5(6):1598-1602. Epub 2013 Apr 9.
- WHEELER CM, HUNT WC, JOSTE NE, KEY CR, QUINT WG, CASTLE PE. Human papillomavirus genotype distributions: implications for vaccination and cancer screening in the United States. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101:475–87.
- WHO. Comprehensive cervical cancer control A guide to essential practice - Second edition Authors: WHO Number of pages: 364 pages Publication date: December 2014 ISBN: 978 92 4 154895 3.
- YOKOI E, MABUCHI S, TAKAHASHI R, MATSUMOTO Y, KURODA H, KOZASA K, KIMURA T. Impact of histological subtype on survival in patients with locally advanced cervical cancer that were treated with definitive radiotherapy: adenocarcinoma/adenosquamous carcinoma versus squamous cell carcinoma. *J Gynecol Oncol*. 2017 28(2):e19. doi: 10.3802/jgo.2017.28.e19.
- ZHANG W, HE W, SHI Y, GU H, LI M, LIU Z, FENG Y, ZHENG N, XIE C, ZHANG Y. High Expression of KIF20A Is Associated with Poor Overall Survival and Tumor Progression in Early-Stage Cervical Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One*. 2016 12;11(12):e0167449. doi: 10.1371/journal.pone.0167449.

ANEXOS

Anexo 1– Parecer do Comitê de Ética, TCLE.

Anexo 2 – Ficha de coleta de dados.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do status dos genes CADM-1, SOX17, DKK3, SFRP2 e WIF-1 e tipos de HPV em câncer cervical e associação com a origem e o estadiamento da neoplasia cervical.

Pesquisador: Sílvia Helena Rabelo dos Santos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 35764014.5.3001.0031

Instituição Proponente: Faculdade de Farmácia Universidade Federal de Goiás

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 867.330

Data da Relatoria: 05/11/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto que fará parte de 1 dissertação de Mestrado e uma Tese de Doutorado de farmácias, abordando-se o papel da hipermetilação gerada por HPV em diferentes histologias (CEC e adenocarcinoma) do ca de colo uterino. Há estes 2 grupos (100 pacientes p cada histologia) e um grupo de 50 mulheres sem ca (controle). Serão revisados blocos de parafina de mulheres operadas no HAJ a partir de 2008 (pelo SGM) e enviado material para PCR p pesquisar mutações em genes que caracterizam hipermetilação (CADM-1, SOX17, DKK3, SFRP2 e WIF-1 e tipos de HPV). Os achados serão confrontados com o prognóstico e evolução clínica das pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo principal: analisar o status de metilação dos genes CADM-1, SOX17, DKK3, SFRP2 e WIF1, tipos específicos de HPV no câncer do colo do útero e testar a associação entre status variáveis com o estadiamento e o grau de diferenciação das lesões cervicais escamosas e glandulares.

Objetivos secundários: analisar a associação entre o status de metilação dos CADM-1, SOX17, DKK3, SFRP2 e WIF-1 com os tipos específicos de HPV; analisar a associação entre o status de metilação dos CADM-1, SOX17, DKK3, SFRP2 e WIF-1 e os carcinomas escamosos e adenocarcinomas do colo de útero; analisar a interação entre o status de metilação dos CADM-1, SOX17, DKK3, SFRP2 e WIF-1, os tipos de HPV e o grau de diferenciação das neoplasias escamosas

Endereço: 239

Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO

CEP: 74.605-070

UF: GO

Município: GOIÂNIA

Telefone: (62)3243-7050

Fax: (62)3243-7050

E-mail: cepcecg@ecog.org.br

Continuação do Parecer: 007.330

e glandulares com prognóstico das neoplasias cervicais e sobrevida das pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não foram identificados riscos pelas pesquisadoras, uma vez em que não haverá mudança de conduta já assumida às pacientes tratadas. O anonimato e respeito às questões éticas e humanas serão respeitados. Como benefícios os pesquisadores esperam com o desenvolvimento deste projeto, verificar a possibilidade de prever o comportamento de uma lesão escamosa ou glandular através da análise de marcadores prognósticos. Do ponto de vista da inovação tecnológica, o desafio consiste, no momento seguinte a este projeto, tornar aplicável à rotina clínica, possíveis biomarcadores, considerando o custo e a operacionalidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa retrospectiva com manejo de prontuários e blocos de parafina acerca da população mencionada. O material gerado irá fomentar a produção de 2 pós-graduações que poderão agregar informações importantes e necessárias sobre o real papel do HPV no ca colo uterino. Há verba advinda do Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação aprovada para viabilizar o estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A Instituição proponente é a UFG e possui aprovação pelo CEP da referida Instituição.

O TCLE é dispensável (e justificável). CVs listados no fim do projeto (adequados)

Não há carta de ciência do IEP ACCG, nem do SAME HAJ, nem o SAP ou SGM. Há ciência e aprovação pelo Diretor do HAJ. A Dra Luciana Ximenes (SAP) é mencionada como colaboradora, mas também sem documento de ciência do projeto.

Recomendações:

Entendo não haver dilemas éticos contrários a aprovação do projeto, porém sugiro que se apresente todos os documentos listados acima

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovação com recomendações

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: 239
Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO CEP: 74.605-070
UF: GO Município: GOIÂNIA
Telefone: (62)3243-7050 Fax: (62)3243-7050 E-mail: cepaccg@accg.org.br

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE
AO CÂNCER EM GOIÁS -



Continuação do Parecer: 007.330

Considerações Finais a critério do CEP:

Providenciar os documentos listados, após isso, considerar o estudo aprovado.

GOIANIA, 11 de Novembro de 2014

Assinado por:
Adriano de Paula
(Coordenador)

Endereço: 239

Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITARIO

CEP: 74.805-070

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3243-7050

Fax: (62)3243-7050

E-mail: cepiccg@eccg.org.br

Página 02 de 02

Ficha de coleta de dados

Projeto:

Prontuário: _____ Data do diagnóstico: ____/____/____

Nome: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: _____ Telefone: _____

Estado civil: (1) Solteiro (2) Casado (3) Outro _____ (4) Não informado

Escolaridade: (1) Fundamental (2) Ens. Médio (3) Superior (4) Não informado

Idade à primeira relação sexual: _____ (1) Não informado

Opção sexual: (1) Homossexual (2) Heterossexual (3) Não informado

Antecedente câncer: (1) Sim (2) Não (3) Não informado

Histórico familiar: (1) Sim (2) Não (3) Não informado

Tabagismo: (1) Sim (2) Não (3) ex-tabagista _____ (4) Não informado

Frequência: (1) Às vezes (2) Diariamente (3) Não informado

Quantidade: (1) < 1 maço (2) de 1 a 3 maços (3) > 3 maços

Etilismo: (1) Sim (2) Não (3) Não informado

Frequência: (1) Às vezes (2) Diariamente (3) Não informado

Tipo de bebida: (1) Destilados (2) Fermentado (3) Não informado

Uso de anticoncepcionais orais: (1) Sim (2) Não (3) Não informado

Status menstrual: (1) Menacme (2) Menopausa (3) Não informado

DIAGNÓSTICO

Exame ginecológico: ____/____/____

Resultado: _____
_____ Diagnóstico

citológico: ____/____/____

Resultado: _____

Diagnóstico por biópsia: ____/____/____ Tipo de biópsia: _____

Resultado: _____

Diagnóstico por cirurgia: ____/____/____

Resultado: _____

Outras informações:

_____ Número do AP

a ser analisado: _____ Data do exame: ____/____/____

TRATAMENTO CIRÚRGICO: (1) Sim (2) Não

TIPO CIRÚRGICO: (1) Conização (2) Histerectomia total (3) Histerectomia Radical

(4) Cone+HTA total (5) Cone+HTA radical

TRATAMENTO RADIOTERÁPICO: (1) Radioterapia externa (2) Braquiterapia (3) ambos

TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO: (1) Sim (2) Não

ESTADIAMENTO CLÍNICO: _____

Tamanho do tumor: _____ (1) Não específico

Extensão da lesão: (1) IA (2) IB (3) IIA (4) IIB (5) IIIA (6) IIIB

(7) IVA (8) IVB (9) Não especificado

Comprometimento linfonodal: (1) NX (2) NO (3) N1,

LN comprometidos _____

Local _____

Metástase: (1) MX (2) MO (3) M1, Local: _____

DADOS ANATOMO PATOLÓGICOS

Tipo histológico: (1) Ca Escamoso (2) Adenocarcinoma (3) Adenoescamoso

(4) Outros _____.

Grau tumoral _____ Índice mitótico _____

Levantamento da quantidade de biopsias e características das peças:

EVOLUÇÃO DO PACIENTE:

(1) Viva, sem evidência de doença, último seguimento ____/____/____.

(2) Viva, com evidência de doença, último seguimento ____/____/____.

(3) Óbito, data ____/____/____.

Coletado por: _____, em ____/____/____.