



**Universidade Federal de Pernambuco
Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami
Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde**

PENÉLOPE RODRIGUES ARAÚJO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE SIRTUÍNAS 1, 3 E 5 NO CÂNCER DE COLO DE
ÚTERO**

**Recife
2017**

PENÉLOPE RODRIGUES ARAÚJO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE SIRTUÍNAS 1, 3 E 5 NO CÂNCER DE COLO DE
ÚTERO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Coorientadora: Prof. Dra. Danyelly Bruneska
Gondim Martins

**Recife
2017**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Araújo, Pénélope Rodrigues

Análise da expressão de sirtuínas 1,3 e 5 no câncer de colo de útero/
Pénélope Rodrigues Araújo- 2017.

46 folhas: il., fig., tab.

Orientador: José Luiz de Lima Filho

Coorientadora: Danyelly Brunaska Gondim Martins

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2017.

Inclui referências

1. Colo uterino- câncer 2. Papilomavírus 3. Biomarcadores em doenças
I. Lima Filho, José Luiz de (orient.) II. Martins, Danyelly Brunaska
Gondim (coorient.) III. Título

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-055

PENÉLOPE RODRIGUES ARAÚJO

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE SIRTUÍNAS 1, 3 E 5 NO CÂNCER DE COLO DE ÚTERO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Coorientadora: Prof. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Aprovada em: 10/03/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho/UFPE

Prof. Dr. Fabrício de Oliveira Souto/UFPE

Prof. Dr. José Luiz Figueiredo/IMIP

Aos meus pacientes, pela coragem e
heroísmo ao lidar com suas doenças,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida e saúde.

Ao meu pai Ézio, professor dessa Universidade há 43 anos, que é meu grande exemplo de vida acadêmica;

A minha mãe Graça que é minha fortaleza de força e doçura;

A meu marido Raphael, meu companheiro nesta vida;

Aos meus amigos de LIKA Ananda Aguiar, Renata Bezerra, Maria de Fátima Cardoso, Joana Darc, Andriu Catena e Amélia Borba companheiros de jornada científica;

A Luiz Alberto Mattos que me trouxe ao LIKA;

A Dra. Iolanda Matias, pela participação na pesquisa e amizade;

Ao amigo de profissão e de vida Glauber Leitão;

Ao Prof. José Luiz pelo incentivo e apoio e à Prof. Danyelly Brunaska pela alegria, pelas palavras, pela orientação científica.

A todos os professores do LIKA pelo aprendizado, especialmente ao Prof. Luiz Bezerra que é uma grande exemplo de docência e humanidade.

E meu carinho especial a todos os outros amigos de LIKA que não foram citados mas que são amigos que fiz pra a vida.

RESUMO

O Câncer de Colo Uterino é um importante problema de saúde pública no mundo, especialmente em países em desenvolvimento. No Brasil, a estimativa de incidência de casos novos em 2016 foi de 16.340 casos. O Papiloma Vírus Humano (HPV) é o agente etiológico de 95% dos cânceres de colo de útero. O HPV 16 causa cerca de 65% dos cânceres cervicais, além de tumores mais raros como ano-genitais e de orofaringe, o que faz do HPV 16 um dos carcinógenos humanos mais potentes. No entanto, não se sabe que infecção vai persistir, que infecção vai dar origem a lesões pré-cancerígenas e que lesões pré-cancerígenas vão progredir pra câncer, e que fatores vão participar ou influenciar esse processo. Desta forma, biomarcadores são essenciais para o entendimento e futuras intervenções - medicamentosas ou não - no processo. Na busca por esses biomarcadores algumas moléculas vêm ganhando grande interesse da comunidade científica como as Sirtuínas (SIRTs). SIRTs são uma família de Desacetilases de Histonas dependente de NAD⁺. Existem sete SIRTs com diversas localizações celulares e funções. Essas proteínas estão envolvidas em processos celulares importantes como resposta ao estresse, sobrevivência celular, metabolismo, senescência, envelhecimento, supressão e promoção de câncer pela desacetilação de vários substratos. O objetivo desse estudo foi elucidar o significado funcional e clinico-patológico da expressão de SIRT1, SIRT3 e SIRT5 no Câncer de Colo de Útero. Análise de níveis de expressão gênica foram realizados em amostras de Câncer cervical e os resultados correlacionados aos dados obtidos dos prontuários das pacientes. Os resultados obtidos apresentam grande importância na compreensão do desenvolvimento do câncer cervical.

Palavras-chave: Papilomavírus humano. SIRT1. SIRT3. SIRT 5. Câncer Cervical.

ABSTRACT

Cervical cancer is a major public health problem in the world, especially in developing countries. In Brazil, the estimated incidence of new cases in 2016 was 16,340 cases. Human Papilloma Virus (HPV) is the etiologic agent, a necessary cause of cervical cancer. HPV 16 causes 65% of cervical cancers, as well as rarer tumors such as ano-genital and oropharynx, making HPV 16 one of them potent human carcinogens. However, it is not known that infection will persist, that infection will give rise to pre-cancerous lesions and that pre-cancerous lesions will progress to cancer, and what factors will participate or influence this process. In this way, biomarkers are essential for understanding and future interventions - medicines or not - in the process. In the search for these biomarkers some molecules have been gaining great interest from the scientific community as the Sirtuins. Sirtuins (SIRT) are a family of NAD-dependent histone deacetylases (NAD⁺-dependent class III histone deacetylases - HDACs). There are seven SIRTs with several subcellular locations and functions. These proteins are involved in critical cellular processes including stress response, cell survival, metabolism, senescence, aging, and tumorigenesis by the acetylation of various substrates. The objective of this study was to elucidate the functional and clinical-pathological significance of SIRT1, SIRT3 and SIRT5 expression in Uterine Cervical Cancer. Analysis of gene expression levels were performed and the results correlated to the data obtained in the patients' medical records. The results obtained are of great importance in understanding the development of cervical cancer and the therapeutic response presented by the patient.

Keywords: Human papillomavirus. SIRT1. SIRT3. SIRT5. Cervical cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Incidência Mundial de Câncer Cervical	12
Figura 2: HPVs são classificados em 5 grupos evolucionários. Os HPVs que infectam a cérvix são do tipo Alpha, que contém mais de 60 tipos. Os HPVs dos grupos Beta, Gamma, Mu e Nu infectam primariamente a pele.	14
Figura 3: Genoma do HPV.....	15
Figura 4: Organização do genoma do HPV e ciclo de vida do vírus.	20
Figura 5: Relação do momento de expressão dos genes HPV e lesões histológicas.....	23
Figura 6: Árvore Filogenética de HADCs humanas.....	28
Figura 7: Localização Intracelular das Sirtuínas.....	29
Figura 8: Modelo hipotético de interação entre SIRT1, p53, HIC1 e FOXO3.....	32
Figura 9: Substratos e Funções biológicas da SIRT 1.....	33
Figura 10: Funções das Sirtuínas Mitocondriais.....	36
Figura 11: Análise de expressão gênica de <i>SIRT1</i> , <i>SIRT3</i> e <i>SIRT5</i> de acordo a ocorrência de aborto.....	42
Figura 12: Análise de expressão gênica de <i>SIRT1</i> , <i>SIRT3</i> e <i>SIRT5</i> de acordo o tempo de exposição ao estrógeno desde a menarca até o momento do diagnóstico de câncer cervical.	43
Figura 13: Análise de expressão gênica de <i>SIRT1</i> , <i>SIRT3</i> e <i>SIRT5</i> de acordo o grau histológico....	43
Figura 14: Análise de expressão gênica de <i>SIRT1</i> , <i>SIRT3</i> e <i>SIRT5</i> de acordo a idade da paciente no momento do diagnóstico de câncer cervical.....	44
Figura 15: Análise de expressão gênica de <i>SIRT1</i> , <i>SIRT3</i> e <i>SIRT5</i> de acordo os níveis de IMC como Normal (N), Sobrepeso (Sp) e Obeso (O).	44
Figura 16: Análise de expressão gênica de <i>SIRT1</i> , <i>SIRT3</i> e <i>SIRT5</i> de acordo com o relato de tabagismo.	45
Figura 17: Análise de expressão gênica de <i>SIRT1</i> , <i>SIRT3</i> e <i>SIRT5</i> de acordo consumo de álcool. .	45
Figura 18: Expressão relativa de <i>SIRT1</i> e <i>SIRT5</i> entre amostras tumorais e normais, por paciente.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação entre os Sistemas de Classificação Histológicas e Citológicas.....	22
Tabela 2: Genes envolvidos na carcinogênese cervical e suas funções.....	25
Tabela 3. Dados Epidemiológicos e Anatomopatológicos.....	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE COLO DE ÚTERO	12
2.2 FISIOPATOLOGIA DO CÂNCER DE COLO DE ÚTERO	13
2.2.1 Papiloma Vírus Humano (HPV)	13
2.2.2 Estabelecimento da Infecção	16
2.2.3 Estímulo a Proliferação	17
2.2.4 Amplificação do Genoma.....	18
2.2.5 Montagem e Liberação Viral	19
2.3 ASPECTOS CITOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS.....	20
2.4 ASPECTOS MOLECULARES NA PROGRESSÃO DO CÂNCER.....	22
2.5 GENÔMICA E EPIGENÉTICA NO CÂNCER CERVICAL	24
2.6 SIRTUÍNAS	27
2.6.1 Sirtuína 1	30
2.6.2 Sirtuína 3	34
2.6.3 Sirtuína 5	35
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL.....	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 METODOLOGIA.....	39
4.1 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS E ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA	39
4.2 EXTRAÇÃO DE RNA	39
4.3 TRANSCRIÇÃO REVERSA E PCR QUANTITATIVO (QPCR)	40
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5 RESULTADOS	41
6 DISCUSSÃO.....	47
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	49
REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

Câncer Cervical é o terceiro tumor mais frequente na população feminina, atrás do câncer de mama e do colorretal, e a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou cerca de 16.340 novos casos de câncer cervical em 2016 (Instituto Nacional de Câncer, 2016).

O método de rastreamento do câncer do colo do útero e de suas lesões precursoras é o exame de Papanicolau, popularmente conhecido como preventivo. O procedimento identifica lesões que antecedem o câncer, permitindo o tratamento antes que a doença se desenvolva. As novas diretrizes recomendam que o intervalo entre os exames deva ser de três anos, após dois exames negativos, com intervalo anual (Ministério da Saúde, 2011).

O Papilomavírus Humano (HPV) é o principal fator etiológico do câncer cervical, e a infecção persistente pelo HPV tem sido claramente associada ao desenvolvimento de câncer cervical. Cerca de 80% de todos os cânceres cervicais são relacionados à presença dos genótipos oncogênicos HPV16 e HPV18 (BAUDU et al., 2014). No entanto, existem outros cofatores relacionados ao desenvolvimento do HPV que incluem níveis hormonais, perfil genético e a resposta imune do hospedeiro; além do genótipo de HPV, infecção múltipla e a carga viral (PINTO; TULIO; CRUZ, 2002).

No entanto, muitos questionamentos faltam ser elucidados pois não se sabe qual infecção irá persistir, qual infecção dará origem a lesões pré-cancerígenas, quais lesões pré-cancerígenas vão progredir pra câncer, e que fatores vão participar ou influenciar esse processo. Desta forma, biomarcadores são essenciais para o entendimento e futuras intervenções, medicamentosas ou não, no processo. Na busca por esses biomarcadores algumas moléculas vêm ganhando grande interesse da comunidade científica como as Sirtuínas (SIRTs) (SCHIFFMAN et al., 2016).

As SIRTs são uma família de Desacetilases de Histonas dependente de NAD⁺ (do inglês: NAD⁺ - *nicotinamide adenine dinucleotide*). Existem sete SIRTs com diversas localizações celulares e funções. Essas proteínas estão envolvidas em processos celulares críticos incluindo resposta ao estresse, sobrevivência celular, metabolismo, senescência, envelhecimento e carcinogênese pela desacetilação de vários substratos (MEI et al., 2016).

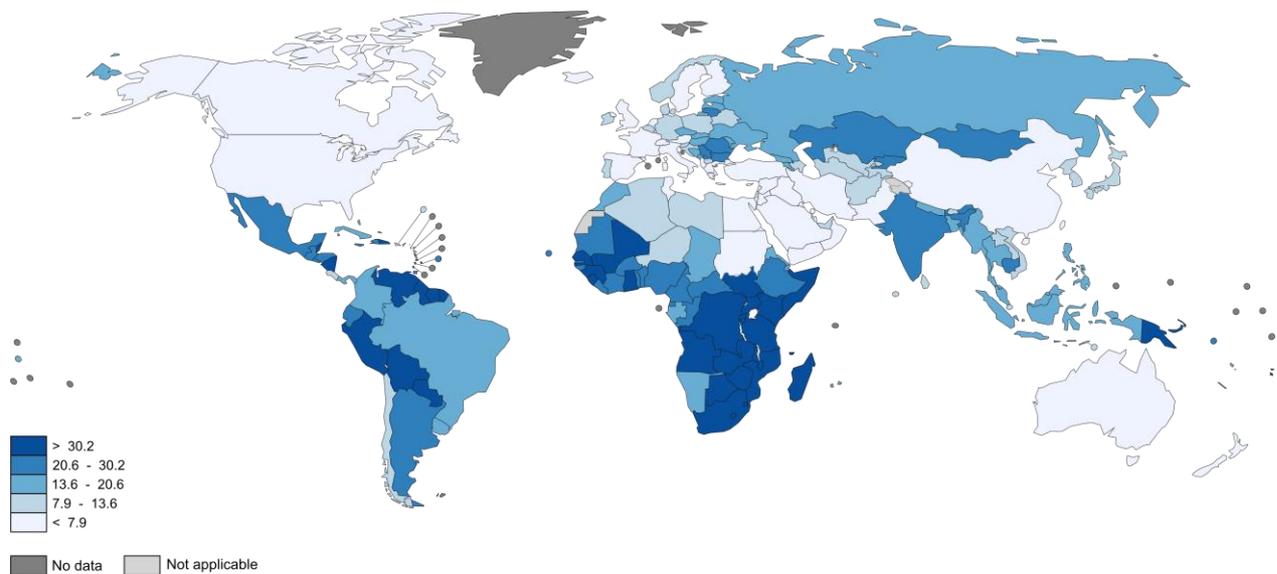
O presente estudo teve o objetivo de elucidar o significado funcional e clinico-patológico da expressão de SIRT1, SIRT3 e SIRT5 no Câncer de Colo de Útero.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE COLO DE ÚTERO

O câncer cervical é um importante problema de saúde pública no mundo devido às suas altas taxas de prevalência e mortalidade. São esperados 528.000 novos casos e 226.000 mortes por ano no mundo, mais que qualquer outro tumor ginecológico. Este é o segundo tumor maligno mais frequente em mulheres no mundo e a terceira causa de mortalidade por câncer em mulheres de países menos desenvolvidos. Existe uma relação inversa entre taxa de câncer cervical e o nível de desenvolvimento do país (FERLAY, 2012). Na Figura 1 observamos a estimativa mundial da incidência do câncer cervical (OMS).

Figura 1: Incidência Mundial de Câncer Cervical



FONTE: Adaptado de FERLAY, 2012

O Instituto Nacional do Câncer (INCA), estimou cerca de 16.340 novos casos de câncer cervical em 2016 no Brasil e um risco estimado de 15,85 por 100 mil habitantes. No Brasil, este é o terceiro tipo de câncer mais incidente em mulheres, ficando atrás, apenas, do câncer de mama e cólon-retos, sendo a quarta causa de morte feminina por câncer (INCA, 2016).

Em uma análise regional, no sexo feminino, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo do útero é o primeiro mais incidente na Região Norte (23,97/100 mil). Nas Regiões Centro-Oeste (20,72/100 mil) e Nordeste (19,49/100 mil), ocupa a segunda

posição; na Região Sudeste (11,30/100 mil), a terceira; e, na Região Sul (15,17 /100 mil), a quarta (INCA, 2016).

As altas taxas de incidência e prevalência de câncer cervical em países pobres devem-se à falta de política pública de saúde eficaz que garanta às mulheres acesso à prevenção secundária (Citologia cervical – Papanicolau - e teste de detecção de DNA ou RNA de HPV em amostras cervicais), como também prevenção primária - vacinação ampla da população contra os HPVs de alto risco.

No Brasil, somente em 2014, o Ministério da Saúde incorporou a vacina polivalente do HPV (contra HPV 6, 11, 16, 18) em seu Calendário Nacional de Vacinação do Sistema Único de Saúde (SUS) para o sexo feminino (adolescentes entre 09 e 13 anos, e entre 9 e 26 anos para portadores de vírus da Imunodeficiência humana - HIV). Em 2017, foi implementado o sistema de vacinação para o sexo masculino (adolescentes entre 12 e 13; e entre 9 e 26 anos para portadores de HIV).

A vacinação é o meio mais eficaz de diminuir a incidência e mortalidade do Câncer Cervical e ainda reduzir a incidência de outros cânceres relacionados a HPV, como anogenitais e de orofaringe. O Brasil foi o primeiro país da América Latina e o sétimo do mundo a oferecer a vacina contra o HPV para meninos em programas nacionais de imunizações. A faixa etária será ampliada, gradativamente, até 2020, quando serão incluídos os meninos com idade de 9 até 13 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

2.2 FISIOPATOLOGIA DO CÂNCER DE COLO DE ÚTERO

2.2.1 Papiloma Vírus Humano (HPV)

O Papiloma Vírus Humano (HPV) é o agente etiológico do câncer de colo de útero em 95% dos casos, já que em outros 5% dos não foram encontradas sequências de nenhum dos HPVs descritos (THE CANCER GENOMA ATLAS RESEARCH NETWORK, 2017). Há mais de 100 genótipos de HPV infectando humanos, categorizados em alto (p. ex. HPV16 e HPV18) e baixo risco (p. ex. HPV6 e HPV11) de acordo com seu potencial carcinogênico (SCHIFFMAN et al., 2016).

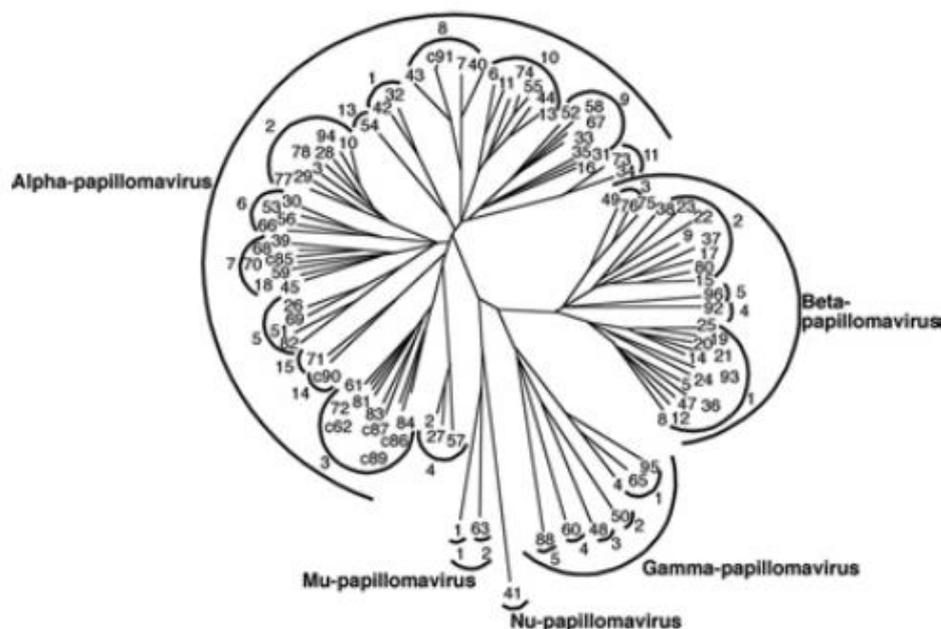
Existem 13 genótipos de HPV transmitidos sexualmente, os HPV16 e 18 são os mais identificados em câncer de colo de útero e causam 65% e 15% dos cânceres cervicais, respectivamente. O HPV16 também causa cânceres mais raros como ano-genitais e de orofaringe, o que faz deste genótipo um dos carcinógenos humanos mais potentes (SCHIFFMAN et al., 2016).

A maioria dos ramos evolutivos do HPV são dos gêneros Alpha, Beta e Gamma; onde observa-se que os vírus evoluíram para infectar epitélios específicos como estratégia de sobrevivência (Figura 2). Muitos tipos de HPV dos gêneros Beta e Gamma estão associados a infecções não aparentes na pele que são adquiridas na primeira infância e podem persistir e produzir partículas virais em baixos níveis ao longo de anos ou décadas. Os HPVs do gênero Mu infectam os epitélios palmar e plantar, produzindo verrugas profundas e altamente produtivas, que tipicamente sofrem *clearance* por resposta imune após meses ou anos (BURK; CHEN; VAN DOORSLAER, 2009).

Membros do gênero Alpha infectam as superfícies muco-cutâneas, ano-genitais e a mucosa do trato aero-digestivo. O gênero Alpha inclui tipos que podem sobreviver sem patologia aparente, outros que causam verrugas altamente produtivas e um importante braço evolutivo com vírus de potencial carcinogênico. Esses tipos de alto risco oncogênicos pertencem a um único braço do gênero Alpha (BURK; CHEN; VAN DOORSLAER, 2009).

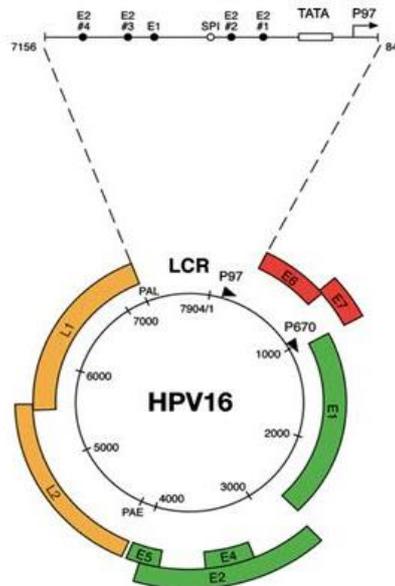
No câncer cervical, um total de 12 tipos de HPV são considerados de alto risco oncogênico: HPV16, HPV31, HPV33, HPV35, HPV52 e HPV58 (em Alpha-9); HPV18, HPV39, HPV45 e HPV59 (Alpha-7); HPV51 (Alpha-5); e HPV56 (Alpha-6). HPV68 (Alpha-7) é provavelmente alto risco, assim como outros vários subtipos que podem ser de alto risco em circunstâncias extremamente raras (BURK; CHEN; VAN DOORSLAER, 2009).

Figura 2: HPVs são classificados em 5 grupos evolucionários. Os HPVs que infectam a cérvix são do tipo Alpha, que contém mais de 60 tipos. Os HPVs dos grupos Beta, Gamma, Mu e Nu infectam primariamente a pele.



O HPV depende da infecção do epitélio para completar sua vida reprodutiva. As partículas dos vírus consistem em uma dupla fita de DNA com aproximadamente 8.000 pares de bases em um capsídeo icosaédrico não-envelopado, composto pelas proteínas L1 e L2. O genoma contém oito ou nove *open read frame* (ORF) que estão codificadas em uma cadeia do genoma: Precoce (*Early*) E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que são expressos por diferentes promotores em diferentes estágios da diferenciação epitelial; e Tardios (*Late*) L1 e L2, que são expressos pelo promotor P670 nas camadas mais superficiais do epitélio. A Região de Controle Longa (do inglês, LCR) é uma região não-codificante do genoma que contém a origem da replicação e as sequências de controle pós-transcricional que contribuem para a expressão gênica (Figura3) (DOORBAR, 2006).

Figura 3: Genoma do HPV



Fonte: DOORBAR (2006)

O desenvolvimento de uma lesão induzida por HPV requer que o vírus acesse a barreira epitelial basal através de uma lesão tecidual, alcançando células indiferenciadas para se estabelecer como epissomo nuclear (sem a integração com o genoma da célula hospedeira). Além disso, mudanças no microambiente local induzida por ferida, incluindo fatores de crescimento em número elevado, podem ser uma chave importante para se estabelecer um reservatório da infecção na camada basal (PYEON et al., 2009).

2.2.2 Estabelecimento da Infecção

Estudos sobre o processo de infecção do HPV têm mostrado que a primeira etapa da é a interação da capsídeo viral com a membrana plasmática das células na camada basal do epitélio. Este evento é mediado principalmente pela L1, a principal proteína do capsídeo que interage com a superfície da célula através de proteoglicanos de heparam-sulfato (TOMMASINO, 2014). Assim como outros vírus, parece que o HPV necessita de receptores secundários para infecção eficiente, papel que, em alguns casos, é desempenhado pela $\alpha 6$ -integrina. A partir de então, as partículas de Papilomavírus são desmontadas em endossomos e/ou lisossomos, que transferem o DNA viral para o núcleo – processo facilitado pela proteína menor do capsídeo L2 (SHAFTI-KERAMAT et al., 2003).

Desta forma, a infecção leva ao estabelecimento do genoma viral como um epissomo estável nas células da camada basal, o que requer a expressão das proteínas E1 e E2. A proteína E2 desempenha vários papéis durante a infecção produtiva, sendo necessária para a iniciação da replicação do DNA e segregação do genoma.

A proteína E2 associa-se a E1 através de sua porção N-terminal e liga-se ao DNA viral como um dímero por sua porção C-terminal. E2 reconhece um motivo palindrômico [AACCg(N4)cGGTT] na região não-codificadora do genoma viral, recrutando a E1 para exercer sua função de helicase na origem viral. E1 e E2 se ligam cooperativamente a origem viral de replicação (*ori*), formando o complexo E1-E2-*ori* que é essencial para a iniciação da replicação do DNA. A formação do complexo E1-E2 na origem de replicação induz uma distorção no DNA viral que facilita o recrutamento de mais moléculas E1 e, eventualmente, a saída de E2 (TITOLO et al., 1999). Todas as demais proteínas de replicação, incluindo a DNA-polimerase α -primase, são derivadas da célula hospedeira (MASTERSON et al., 1998). Experimentos têm demonstrado que existe um aumento de dois log no número de cópias durante a amplificação gênica *in vitro*. A extensão da amplificação gênica pode ser ainda maior (quatro-log) durante a infecção *in vivo*, como sugerido em análise de captura por laser em ratos (MAGLENNON; MCINTOSH; DOORBAR, 2011).

Na célula basal, o genoma viral se replica junto com o DNA viral durante a fase S, com o genoma replicado sendo seccionado durante a divisão celular. O papel de E2 em ancorar o epissoma viral nos cromossomos mitóticos é essencial para uma correta separação e, em alguns tipos de HPV, envolve uma proteína celular Brd4, que associa-se diretamente com a porção C-terminal da proteína E2. Para os HPV de alto-risco, a associação parece ser

via fuso mitótico, com envolvimento de algumas proteínas celulares. Em adição ao seu papel da replicação e segregação cromossômica, E2 pode agir como fator de transcrição e regular a promoção viral inicial (p97 no HPV16; p99 no HPV31), controlando a expressão dos oncogenes E6 e E7. Em níveis baixos, E2 atua como ativador transcricional, enquanto que em altos níveis E2 reprime a expressão dos oncogenes deslocando o fator transcricional de um lugar adjacente ao promotor inicial (YOU et al., 2004).

2.2.3 Estímulo a Proliferação

Nas lesões cervicais induzidas por HPV, o aumento da proliferação na células do epitélio acima da camada basal é ocasionada pela expressão dos oncogenes virais E6 e E7. Durante a infecção natural, a atividade desses genes permite que o pequeno número de células infectadas se expanda, aumentando o número de células que subsequentemente vão produzir vírions infectantes. A habilidade de E6 e E7 em estimular células a entrar na fase S é crucial, juntamente com E1 e E2 para replicar os episomas virais acima da camada basal (KIM et al., 2003).

Células suprabasais normalmente saem do ciclo celular e iniciam o processo de diferenciação celular, mas em queratinócitos infectados por HPV a restrição de progressão do ciclo celular é perdida, e a diferenciação terminal não ocorre. O mecanismo básico de estímulo a progressão do ciclo celular é bem conhecida, sendo similar ao modo como outros tumores desregulam o crescimento celular (MADISON, 2003).

A proteína E7 se associa a proteína do Retinoblastoma (pRB) e estimula a ligação entre pRB e a família E2F de fatores de transcrição envolvidos na mesma cascata de sinalização, que ativa proteínas necessárias para replicação de DNA como as ciclinas A e E. Além disso, E7 também se associa com outras proteínas envolvidas na proliferação celular, incluindo deacetilases de histonas, componentes do complexo AP1 transcricional e inibidores de cinases dependentes de ciclina p21 e p27. Entretanto, a habilidade de E7 em estimular proliferação está inibida em algumas células, dependendo dos níveis de p21 e p27, uma vez altos níveis de p21 e p27 levam a inativação de complexos com E7 e ciclina E (ANTINORE et al., 1996).

A função da proteína E6 complementa a função de E7, ligando-se à p53 elevando-a à degradação mediada por ubiquitinação. Desta forma, E6 não permite apoptose ou parada de crescimento em resposta às alterações celulares causadas por E7, sendo este um papel de E6 no desenvolvimento do câncer cervical pois compromete a efetividade da resposta celular ao

dano de DNA e permite acúmulo de mutações secundárias. A proteína E6 de HPV de alto risco também intervém na proliferação celular independente de E7 através de seu domínio de ligação PDZ, nome que deriva do primeiro nome de três proteínas em que esses domínios são encontrados: PSD-95 (proteína de envolvida na sinalização), Dlg (proteína de *Drosophila*), e ZO1 (a proteína *zonula occludens*, da polaridade celular). E6-PDZ estimula a proliferação de células suprabasais e pode contribuir para o desenvolvimento de metástases por afetar a adesão celular (NGUYEN et al., 2003).

2.2.4 Amplificação do Genoma

Embora proliferação celular seja necessária para formação de lesão e manutenção de epissomas virais, os papilomavírus precisam amplificar e empacotar seus genomas para produzir vírions infectantes. O que inicia esse processo não está completamente elucidado, mas parece depender em parte de mudanças no ambiente celular quando ela se move em direção à superfície do epitélio. O ativação do promotor de diferenciação celular é crítico nesse processo, esse promotor está contido na ORF E7 na maioria dos HPVs (p670 no HPV16; p742 no HPV31), e depende da mudanças na sinalização celular que leva ao aumento nos níveis de proteínas necessárias para a replicação (E1, E2, E4 e E5) (BODILY; MEYERS, 2005).

Por outro lado, o papel de E1 e E2 na amplificação do genoma está bem estabelecida. As proteínas E4 e E5 também participam da amplificação do genoma. E5 é uma proteína transmembrana e tem a ação de estabilizar o receptor do Fator de Crescimento do Endotélio (do inglês, *epidermal growth factor* - EGF) e aumentar a atividade da MAP quinase (do inglês, *mitogen-activated protein* - MAP). E5 também modula as quinases reguladoras de sinal extracelular 1/2 (do inglês, *extracellular-signal-regulated kinase* - ERK 1/2) e p38, independente do sinal de EGF. A proteína E4, que acumula-se em altos níveis nas células que estão com vírus sendo sintetizado, aparentemente têm a função de liberação do vírus e transmissão, mas também participa da amplificação do genoma. Em HPVs de alto risco, a proteína E4 agrega-se a fibrilas amilóides que podem romper a estrutura de queratina das camadas mais superiores do epitélio e assim contribuir para a infectividade e transmissão viral (EGAWA et al., 2015).

2.2.5 Montagem e Liberação Viral

O estágio final do ciclo produtivo do HPV requer que genoma replicado seja empacotado em partículas infectantes. As proteínas do capsídeo (L1 e L2) acumulam-se após a amplificação do genoma, sendo a expressão de L1 precedida pela expressão de L2. Os eventos que ligam a amplificação do genoma ao seu empacotamento não são totalmente compreendidos, mas dependem do *splicing* de mRNA e da geração de transcritos que terminam no local de poliadenilação tardia (do inglês, *late polyadenylation site*, LPS) - ao invés de lugar de poliadenilação inicial (do inglês, *early polyadenylation site*, EPS) (WEN; WANG, 2009).

Durante a diferenciação epitelial celular, o momento da síntese do capsídeo é regulada tanto a nível de RNA quanto a nível de síntese de proteínas. Elementos regulatórios negativos que controlam a estabilidade de RNA estão presentes nas regiões codificadoras e na região LCR do HPV 16, enquanto que um silenciador de *splicing* no gene L1 leva a síntese preferencial de transcritos iniciais em células em proliferação. Em adição, o padrão de códons nos genes L1 e L2 do HPV contribuem para a inibição da expressão de capsídeo nas camadas mais baixas do epitélio (DOORBAR, 2006).

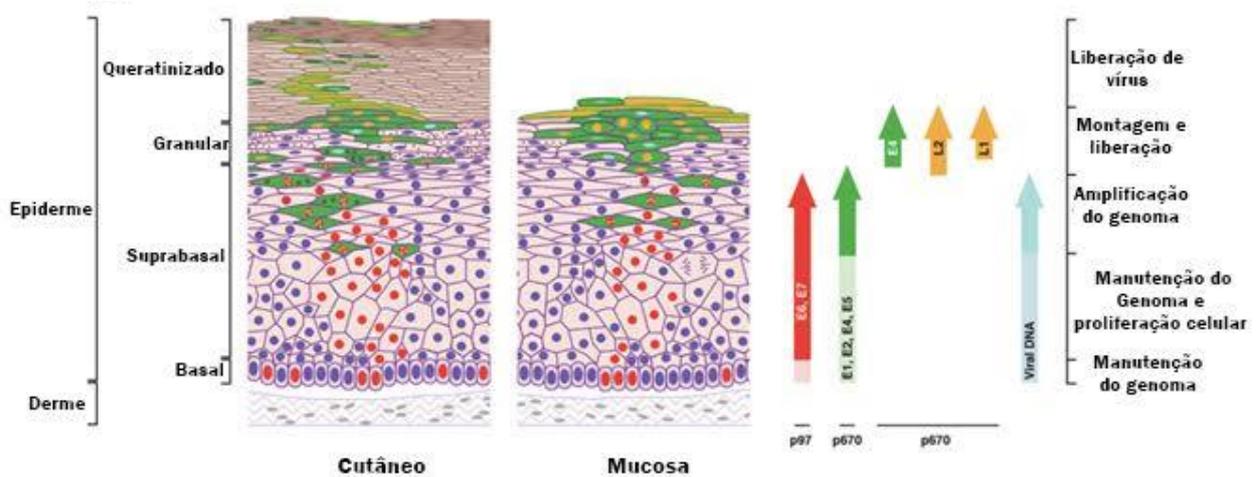
A montagem dos vírions infectantes nas camadas mais superiores do epitélio requer E2, em adição a L1 e L2, e E2 aumenta a eficiência da encapsulação do genoma. L2 localiza-se no núcleo em virtude da localização de sinais nucleares, estando associado a corpos de PML (do inglês: *promyelocytic leukaemia bodies*). Embora algumas proteínas L2 possam se associar diretamente ao DNA viral, o recrutamento específico dos genomas virais para os corpos PML requer a proteína E2. L1 monta-se em capsômeros no citoplasma antes do realojamento no núcleo e do recrutamento em corpos PML, mas somente após L2 ter-se ligado e deslocado o componente sp100 do PML. Embora as partículas do HPV possam montar-se na ausência de L2, a sua presença contribui para um empacotamento mais eficiente e aumento da infectividade viral (FLORIN et al., 2002). Isso foi demonstrado pela deleção do L2 no genoma do HPV31, que resultou em 10 vezes menos eficácia de empacotamento e redução em 100 vezes da infectividade viral quando comparados com HPV31 selvagem (HOLMGREN et al., 2005).

L2 associa-se a L1 através de uma região hidrofóbica perto da porção C-terminal da proteína, que se insere na região central do capsômero pentavalente de L1. A interação entre capsômeros requer a porção C-terminal de L1; com a maturação e estabilização virais ocorrendo na medida em que as células infectadas se aproximam da superfície do epitélio. A

retenção dos antígenos do HPV até que as células cheguem à superfície do epitélio é uma das formas de evasão do sistema imune do hospedeiro (FINNEN et al., 2003). Por último, o lançamento viral requer um escape eficiente do revestimento da superfície celular o que é facilitado pela proteína E4, capaz de quebrar a rede de queratina e afetar a integridade do revestimento epitelial queratinizado (WANG et al., 2004).

A Figura 4 sintetiza as fases do ciclo de vida do HPV relacionadas com anatomia do epitélio infectado e o momento da expressão dos genes virais.

Figura 4: Organização do genoma do HPV e ciclo de vida do vírus.



Fonte: DOORBAR (2006)

2.3 ASPECTOS CITOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS

Em 1920, George Nicholas Papanicolaou elaborou uma técnica para estudar as células vaginais e as do colo uterino conhecida como método de citologia esfoliativa e, durante seus estudos, teve a oportunidade de observar células malignas, propondo que a citologia esfoliativa fosse empregada para diagnosticar câncer do colo uterino. Papanicolaou utilizou os termos “classes” na sua nomenclatura citopatológica e enfatizava que a única categoria conclusiva era a classe V, que significava conclusiva para malignidade. Essa classificação não levava em conta a possibilidade de lesões precursoras, mas apenas a presença ou a ausência de malignidade, e não era possível fazer correlação histopatológica.

Seguiram-se outras classificações como a de James W. Reagan (1953), que definia as displasias como anormalidades celulares intermediárias e que a maioria dessas lesões regredia ou permanecia inalterada por muitos anos, mesmo não sendo tratadas. Reagan e Patten

subdividiram as displasias em leve, moderada e acentuada.

Nas décadas de 1960 e 1970, estudos prospectivos e de análise de ploidia de DNA provaram que displasia acentuada e carcinoma *in situ* eram muito próximos, e uma nova classificação foi proposta por Ralph Richart (Classificação de Richart) utilizando o termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC), pois o termo displasia poderia levar a subtratamento nos casos de displasias acentuadas e supertratamento nos carcinomas *in situ* com realização de histerectomia. Nessa classificação, NIC1 (displasia leve), NIC2 (displasia moderada) e NIC3 (displasia severa e carcinoma *in situ*) diferenciam-se pela fração do epitélio substituído por células indiferenciadas.

Em virtude de muitos conflitos, devidos a diagnósticos citopatológicos discordantes dos achados histológicos e do conhecimento apontando aparente dicotomização biológica entre infecção pelo HPV e neoplasia genuína, desencadeou-se, em 1988, a primeira de uma série de conferências de consenso em Bethesda, Maryland (EUA), para desenvolver uma nova nomenclatura descritiva dos achados da citologia ginecológica, surgindo então a Nomenclatura de Bethesda. Essa nova nomenclatura sugere que a doença intraepitelial cervical não é um processo contínuo, mas sim um sistema de duas doenças descontínuas, criando o conceito de lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) e lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL) (Tabela 1). A lesão de baixo grau é de menos provável progressão para carcinoma invasivo, diferentemente das lesões intraepiteliais de alto grau. Estas são predominantemente causadas por tipos de HPV oncogênicos, tendo comportamento de lesão precursora do carcinoma invasivo. A Nomenclatura de Bethesda foi submetida a revisões em 1991, 2001 e 2014 (BORNSTEIN et al., 2012).

Com a atualização do Sistema de Bethesda, em 2001, e considerando a necessidade de incorporar novas tecnologias e conhecimentos clínicos e morfológicos, o INCA e a Sociedade Brasileira de Citopatologia promoveram o *Seminário para Discussão da Nomenclatura Brasileira de Laudos de Exames Citopatológicos – CITO 2001* e, durante o *XVII Congresso Brasileiro de Citopatologia*, ocorrido em 2002, na cidade de Foz do Iguaçu, no Paraná, a nova proposta foi oficializada. Essa nomenclatura guarda semelhanças com a Nomenclatura de Bethesda e continua em vigência até o presente momento (INCA, 2016).

O quadro a seguir expõe a nomenclatura citopatológica e histopatológica utilizada desde o início do uso do exame citopatológico para o diagnóstico das lesões cervicais e suas equivalências. Nele, a nomenclatura para os exames histopatológicos utilizada é a da Organização Mundial da Saúde (OMS).

Tabela 1: Comparação entre os Sistemas de Classificação Histológicas e Citológicas.

Classificação citológica de Papanicolaou (1941)	Classificação histológica da OMS (1952)	Classificação histológica de Richart (1967)	Sistema Bethesda (2001)	Classificação Citológica Brasileira (2006)
Classe I	-	-	-	-
Classe II	-	-	Alterações benignas	Alterações benignas
-	-	-	Atipias de significado indeterminado	Atipias de significado indeterminado
Classe III	Displasia leve	NIC I	LSIL	LSIL
	Displasia moderada e acentuada	NIC II e NICIII	HSIL	HSIL
Classe IV	Carcinoma <i>in situ</i>	NIC III	HSIL Adenocarcinoma <i>in situ</i> (AIS)	HSIL AIS
Classe V	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor

Fonte: Ministério da Saúde (2016)

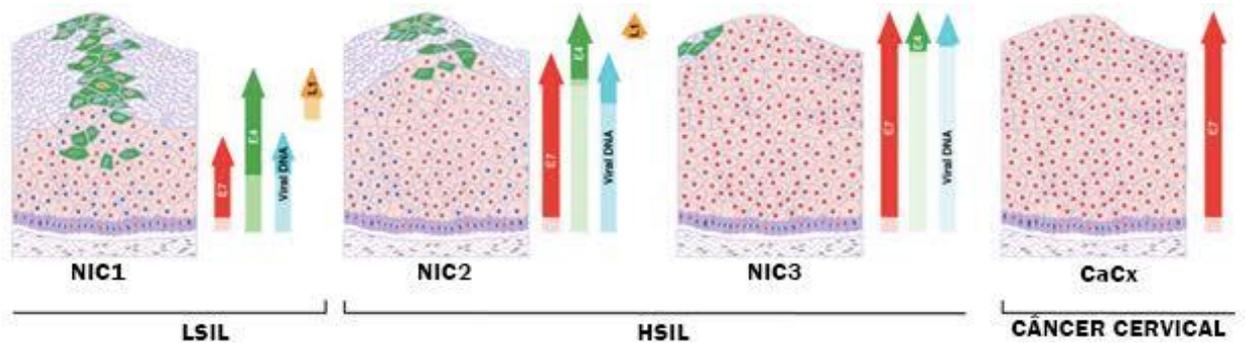
A histopatologia é referência utilizada para decidir se uma paciente com NIC ou câncer deva ser tratada. Embora no modelo conceitual exista uma discriminação até necessária dos passos da carcinogênese, o diagnóstico histológico é baseado num contínuo de mudanças morfológicas com limites arbitrários. Por exemplo, o NIC 3 é considerada um marcador de câncer sendo tipicamente tratado, embora se reconheça que somente algumas dessas lesões viriam a invadir. Em contrapartida, NIC1 é considerado um reflexo morfológico da infecção por HPV não tratada. NIC 2 representa uma mistura heterogênea dos dois grupos, ao invés de uma entidade biológica. Uma grande parte de lesões NIC2 regredem, sugerindo que essas lesões podem ser revisadas como uma infecção severa por HPV ao invés de um pré-câncer. Portanto os clínicos podem decidir por não tratar o NIC2, particularmente em mulheres jovens que provavelmente têm infecção aguda e para quem a questão da fertilidade é importante. Esforços devem ser feitos no uso de biomarcadores para melhorar a avaliação patológica (SCHIFFMAN et al., 2016).

2.4 ASPECTOS MOLECULARES NA PROGRESSÃO DO CÂNCER

As lesões cervicais LSIL, HSIL e câncer refletem as mudanças moleculares na diferenciação normal programada da célula epitelial. A produção de vírus na superfície

epitelial depende da ordem e do momento da expressão dos produtos dos genes virais, com o tempo desses eventos sendo perturbados durante a progressão neoplásica. Nas HSIL, a amplificação do genoma viral acontece mais próxima da superfície epitelial do que nas LSIL, e a expressão de proteínas da capsídeo está retardada (Figura 5). As bases moleculares dessas mudanças não são completamente compreendidas, mas em alguma instância refletem as mudanças no nível de expressão de E6 e E7, que acontecem durante a integração do genoma viral com o cromossomo da células hospedeira. A integração do DNA HPV é encontrada na maioria dos cânceres cervicais e em algumas lesões de alto grau, mas também é encontrada eventualmente nas lesões de baixo grau, sendo um evento inicial na carcinogênese do HPV. De fato, a expressão de p16^{INK4A}, que é considerado um marcador da expressão de E7, é detectada em algumas lesões de baixo grau e alto grau que têm evidências de integração de DNA (MIDDLETON et al., 2003).

Figura 5: Relação do momento de expressão dos genes HPV e lesões histológicas.



Fonte: DOORBAR (2006)

A integração do genoma do HPV ao genoma humano é um evento crítico no desenvolvimento de câncer de colo de útero. Embora possa ocorrer em qualquer porção do genoma humano, alguns estudos têm mostrado a preferência por locais mais frágeis e que mudanças na expressão de genes que estão próximos a regiões de integração também participam da carcinogênese. A integração também leva a desregulação de expressão de E6/E7 e perda de E2, um fato importante para aumentar o crescimento das células malignas (YU et al., 2005).

Embora a integração do HPV DNA seja encontrada na maioria dos cânceres cervicais, outros fatores também influenciam o desenvolvimento dos eventos da carcinogênese, como glicocorticóide e progesterona, que podem afetar a expressão de oncogenes e a regulação de expressão de genes por metilação de DNA e organização de cromatina. A ligação do receptor

de glicorticóide e progesterona a regiões reguladoras encontradas no LCR - chamadas GRE/PRE (do inglês, *glucocorticoide/progesterone response elements*) – induz oncogênese em células cervicais. Isso pode explicar, ao menos em parte, a observação epidemiológica de que o número de partos a termo (maior exposição a progestágenos) correlaciona-se positivamente com o desenvolvimento de câncer de colo de útero; bem como explicar a correlação positiva entre o uso de anticoncepcionais e câncer cervical (CHAN; KLOCK; BERNARD, 1989) (WEYN et al., 2011).

A média de idade do diagnóstico do câncer invasivo sugere que exista um tempo de transição que pode ser de décadas. Alguns estudo epidemiológicos e resultados de laboratório apontam que hormônios esteroides possam ser um cofator para desenvolvimento de câncer cervical. A evidência epidemiológica vem de estudos de coorte e caso-controle que demonstram que multiparidade e uso de contraceptivos hormonais por longo período de tempo aumentam o risco para câncer cervical. Além disso, as curvas de câncer cervical em pacientes onde os exames preventivos não são feitos tendem a ficar baixas após a menopausa, lembrando as curvas de canceres hormônio-dependentes (ex. câncer de mama). Os hormônios sexuais modulam a resposta imune inata e no trato genital feminino, e a proteção imune varia de acordo com as fases do ciclo menstrual. Neste contexto, modelos que sugerem que mudanças hormonais podem afetar diretamente a ativação viral e função de proteínas que resultam em aumento de proliferação celular e neoplasia. A junção escamocelular na zona de transformação exibe alta expressão de receptores de estrógenos e progesterona. O estrógeno promove a produção de interferons e citosinas pró-inflamatórias e o sinal do receptor de estrógeno aumenta ou diminui resposta imune adaptativa e inata (SCHIFFMAN et al., 2016).

2.5 GENÔMICA E EPIGENÉTICA NO CÂNCER CERVICAL

A despeito do documentado papel etiológico da infecção por HPV, os mecanismos moleculares da progressão e os vários passos da carcinogênese do câncer cervical ainda são pouco conhecidos. As células do câncer cervical exibem complexas alterações no cariótipo, desta forma, a caracterização molecular dessas alterações é importante para entender a base genética do câncer cervical, que em última análise facilita a identificação de genes críticos no desenvolvimento do câncer cervical. Ganhos e amplificação nos cromossomos são mecanismos comuns de ativação gênica na carcinogênese (HARRIS et al., 2003).

Estudos sobre expressão gênica e metilação usando tecnologia de alto-rendimento de *microarray* têm sido reportados. Scotto *et al.* fizeram análises de expressão gênica em amostras de câncer cervical e em controles normais e encontraram os genes *E2F1*, *TPX2* e

KIF3B super-expressos como consequência de ganhos no cromossomo 20. Farkas *et al.* conduziram análises sobre metilação de amostras de tumores cervicais e amostras controle normais e identificaram candidatos a biomarcadores que representam vários tipos de mecanismos desregulados por epigenética como receptores de membrana, sinalizadores intracelulares e de transcrição gênica (SCOTTO *et al.*, 2008) (FARKAS *et al.*, 2013).

Um estudo posterior foi feito a partir de uma releitura do banco de dados de expressão de Scotto, *et al.* e dos dados de metilação gênica de Farkas *et al.* associado a uma análise integrada genome-wide de Genes Expressos Diferenciadamente (do inglês, *differentially expressed genes* - DEGs) – com metilação aberrante entre amostras de câncer cervical e controles normais. Também foram analisadas vias de sinalização e riscos de patologia. DEGs com regiões de metilação relacionadas a câncer cervical foram identificados pela intersecção dos resultados dos dois grupos. Um total de 1357 DEGs incluindo 721 hiper-expresso e 636 hipo-expresso, assim como 666 regiões metiladas relacionados a CC foram verificados. Após serem analisados, um total de 26 DEGs e 35 regiões metiladas foram selecionados. Os pesquisadores concluíram, portanto, que os genes *EDN3* e *EDNRB* podem ter um papel importante nos mecanismos moleculares do câncer cervical, assim como *LHX2*, *ACOX3*, *CYP39A1* e *DPYS* podem ser genes de susceptibilidade e marcadores de risco para câncer cervical (Tabela 2) (LIN *et al.*, 2016).

Tabela 2: Genes envolvidos na carcinogênese cervical e suas funções.

Genes	Função
<i>EDN3</i> e <i>EDNRB</i>	Contração do músculo liso, músculo liso vascular e contração fásica do músculo liso.
<i>LHX2</i> e <i>PAX6</i>	Regionalização de telencéfalo e mesencéfalo.
<i>ACOX3</i> , <i>CYP39A1</i> e <i>DPYS</i>	Envolvidos em 25 subvias de 6 vias maiores de sinalização.

Fonte: Adaptado de Lin (2016)

O estudo de Scotto *et al.* examinou o papel do ganho do braço longo do cromossomo 20 (20q), um dos mais comuns ganhos cromossômicos em câncer cervical, em vários estágios da progressão (lesão cervical de baixo e alto grau e câncer cervical versus tecido cervical normal), através da presença de Polimorfismo de Nucleotídeo Único (do inglês, *single nucleotide polymorphism* - SNP), perfil de expressão gênica, e análises de FISH (do inglês, *fluorescence in situ hybridization*). A análise revelou aumento no número de cópias do 20q

em mais de 50% das amostras de câncer cervical e identificou 2 ampliações em 20q11.2 e 20q13.13 num subgrupo de pacientes. Observou-se que o ganho de 20q ocorre numa fase inicial no desenvolvimento e que lesões intraepiteliais de alto grau que exibiam esse ganho em 20q ($p < 0.05$) estavam associadas a persistência ou progressão para câncer. Um total de 26 genes foram identificados como hiper-expressos devido ao ganho de 20q, incluindo genes na regulação do ciclo celular (*E2F1*, *TPX2*, *KIF3B*, *PIGT* e *B4GALT5*), função nuclear (*CSELI*), replicação viral (*PSMA7* e *LAMA5*), metilação e remodelação de cromatina (*ASXLI*, *AHCY* e *C20orf20*) e regulação de transcrição (*TCEA2*) (SCOTTO et al., 2008).

Um estudo multicêntrico avaliou cerca de 228 cânceres cervicais advindos de mais de 25 centros em todo o mundo, incluindo amostras biológicas do Brasil (genômica, proteômica, epigenética e vias de sinalização). Integração do HPV foi observada para 100% dos casos relacionados a HPV18 e 76% dos casos relacionados a HPV16, o que foi associado a alterações estruturais e aumento de expressão de genes-alvo. Todos os cânceres HPV-positivos tiveram uma expressão de mRNA de oncogenes HPV E6 e E7 detectáveis, mas para cânceres com HPV18 observou-se níveis mais altos de transcritos de E6 que em cânceres com HPV16; sugerindo diferentes implicações funcionais de E6 e E7 em tumores associados a diferentes genótipos de HPV. Um total de 88 alterações no número de mutações somáticas por tumor foram observadas, o que é menor do que em Câncer de Cabeça e Pescoço Escamoso, Ovário e Adenocarcinoma Seroso Endometrial. A análise revelou 37 deleções e 26 inserções ao longo de 23 braços cromossômicos alterados: 7p11.2 (*EGFR*; 17%), 9p24.1 (*CD274*, *PDCD1LG2*; 21%), 13q22.1 (*KLF5*; 18%), 16p13.13 (*BCAR4*; 20%), 3q26.31 (*TERC*, *MECOM*; 78%), 3q28 (*TP63*; 77%), 8q24.21 (*MYC*, *PVT1*; 42%), 11q22.1 (*YAP1*, *BIRC2/3*; 17%), 17q12 (*ERBB2*; 17%), 3p24.1 (*TGFBR2*; 36%), 18q21.2 (*SMAD4*; 28%), 4q35.2 (*FAT1*; 36%) e 10q23.31 (*PTEN*; 31%). Algumas mutações presentes nos genes *HLA-A*, *HLA-B*, *NFE2L2*, *MAPK1*, *CASP8*, *SHKBPI*, e *TGFBR2* foram observadas exclusivamente em cânceres escamosos. Foram observados padrões de mutações envolvendo proteínas *APOBEC*; e identificados novos genes mutados de forma significativa no câncer cervical - *SHKBPI*, *ERBB3*, *CASP8*, *HLA-A* e *TGFBR2*; além de confirmadas mutações em *PIK3CA*, *EP300*, *FBXW7*, *HLA-B*, *PTEN*, *NFE2L2*, *ARIDIA*, *KRAS*, e *MAPK1*. Alterações descritas para *ERBB3* (HER3) tem potencial terapêutico, assim como no *BCAR4*, com a droga Lapatinibe, já utilizada para tratamento de câncer de mama. Além disso, foram identificadas alterações em *CD274/PD-L1* e *PDCD1LG2/PD-L2*, dois genes que codificam alvos para imunoterapias já conhecidas. Adicionalmente, identificou-se um grupo único de cânceres de colo de útero semelhante a carcinoma endometrial, que inclui predominantemente tumores

HPV-negativos, com alta frequência de mutações *KRAS*, *ARIDIA* e *PTEN*. Uma análise integrativa de grupos identificou 3 subgrupos de cânceres cervicais nomeados como: Escamoso Pouco Queratinizado, Escamoso Muito Queratinizado e Rico em Adenocarcinoma (THE CANCER GENOMA ATLAS RESEARCH NETWORK, 2017).

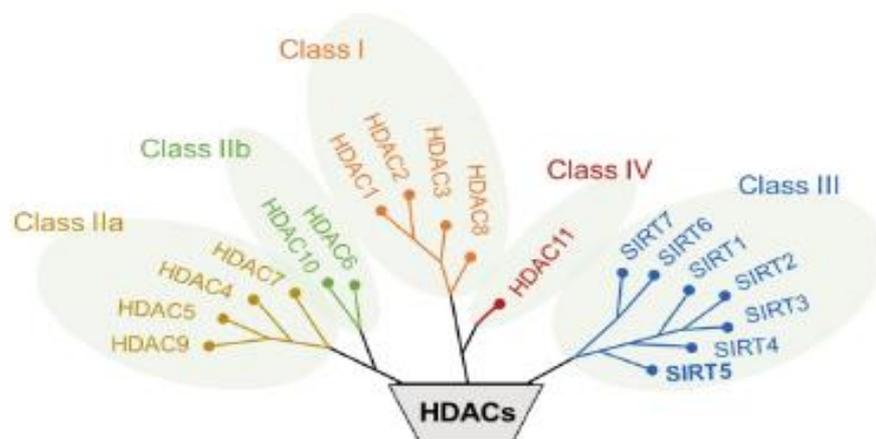
Células cancerígenas alteram a maquinaria celular normal para promover proliferação celular e maximizar sua sobrevivência, mas em consequência de seu crescimento maligno, elas diminuem a sobrevivência de seu organismo hospedeiro. Hanahan e Weinberg descreveram elegantemente os fundamentos da promoção do câncer que consistem em: sinalização sustentada de proliferação, permitindo imortalidade replicativa, ativação de invasão e metástase, indução de angiogênese, reprogramação do metabolismo de energia, evasão do sistema imune e reprogramação de células adjacentes para criar o chamado microambiente tumoral. No entanto, as células normais têm mecanismos para antagonizar os sinais promotores de câncer e as células malignas têm que superar os mecanismos de supressão tumoral. Nesse contexto, a instabilidade genética das células malignas é crucial na carcinogênese (HANAHAH; WEINBERG, 2011). Embora os biólogos do câncer tendam a classificar os genes em promotores ou supressores de câncer, apenas um número limitado de genes está em uma dessas categorias sem ambiguidade, por exemplo, *MYC* é um oncogene e o gene *RB* do retinoblastoma é um supressor tumoral. Outros genes, incluindo as Sirtuínas têm essa função de promotor ou supressor menos definida, e essas propriedades podem depender do estágio de desenvolvimento do câncer e de variáveis como tecido de origem e microambiente. Desta forma, as sirtuínas tem se tornado moléculas de interesse nesse cenário de busca de biomarcadores relacionados a carcinogênese (ROTH; CHEN, 2014).

2.6 SIRTUÍNAS

A acetilação de lisina é uma modificação fundamental que afeta profundamente a atividade de uma proteína, como evidenciado por estudos proteômicos. O estado de acetilação da lisina de proteínas individuais é determinado simultaneamente pelo equilíbrio entre acetilação e desacetilação, um processo catalisado por uma coorte de acetiltransferases e desacetilases, respectivamente. Em contraste com as atividades em grande parte constitutivas e não-seletivas de várias acetiltransferases conhecidas, o mecanismo de desacetilação de proteínas tem sido estudado extensivamente, levando à caracterização de quatro classes de desacetilases, todas as quais apresentam características catalíticas variáveis e perfis de substratos diferentes (XIONG et al., 2016).

As Deacetilases de Histonas (HDACs) são enzimas que removem radicais acetil de grupos amino ϵ -N-acetil-lisina de histonas e várias outras proteínas não-histonas. Baseadas em similaridades estruturais e funcionais, as HDACs de mamíferos estão agrupadas em quatro categorias (Figura 6) que consistem em: Classes I, II e IV composta pelas Desacetilases de Histonas (HDACs) são; sendo Desacetilase de Histona Homóloga a RPD3 (classe I HDACs); classe II HDACs, que divide um grau significativo de homologia com as Deacetilases HAD 1; a mais recente descrita classe IV HDACs, que incluem enzimas relacionadas a HDAC-11, todas dependentes de Zn^{2+} ; e a classe de Sirtuínas Desacetilases de Histonas (HDACs classe III), desacetilases dependentes de NAD^+ onde a SIRT1 é a mais relacionada a Sir2 do *S. cerevisiae* (VOELTER-MAHLKNECHT; MAHLKNECHT, 2006) (YANG et al., 2016).

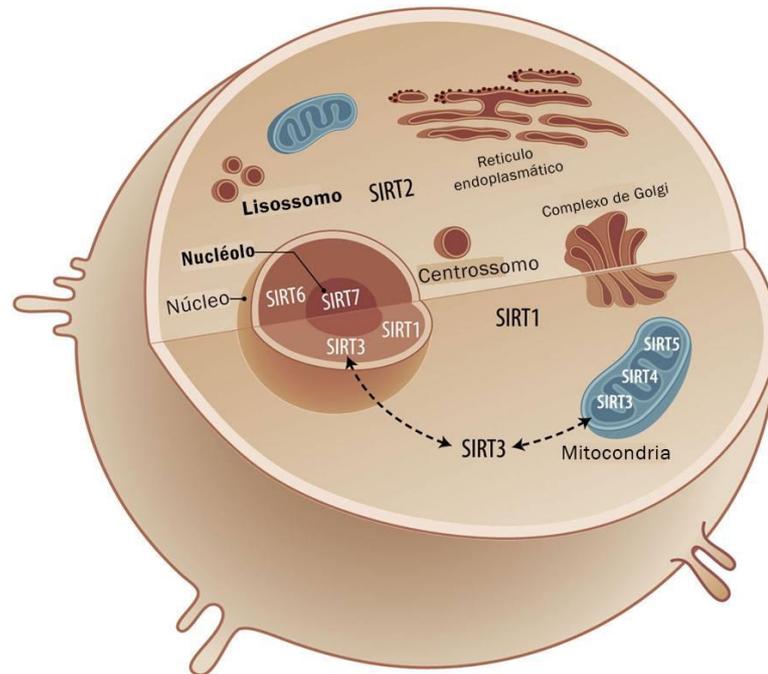
Figura 6: Árvore Filogenética de HDACs humanas.



Fonte: Yang (2016)

As sirtuínas conhecidas de humanos estão agrupadas em 04 classes filogenéticas: SIRT1, SIRT2, SIRT3 (subclasse 1); SIRT4 (subclasse 2); SIRT5 (subclasse 3) e SIRT6 e SIRT7 (subclasse 4). As sete SIRTs têm diversas localizações celulares e funções. SIRT1, SIRT6 e SIRT7 são proteínas nucleares, mas a SIRT1 move-se entre o núcleo e o citoplasma. SIRT3, SIRT4 e SIRT5 são proteínas mitocondriais e SIRT 2 está localizada predominantemente no citoplasma. SIRT2 e SIRT3 também se movem entre diferentes componentes celulares (Figura 7). Essas proteínas estão envolvidas em processos celulares críticos incluindo resposta ao estresse, sobrevivência celular, metabolismo, senescência, envelhecimento e tumorigênese pela desacetilação de vários substratos (E. MICHISHITA , J. PARK, 2005).

Figura 7: Localização Intracelular das Sirtuínas.



Fonte: Alhazzazi et al (2011)

O papel das SIRTs na carcinogênese ainda não está clara, com evidências que demonstram promoção tumoral e supressão tumoral, dependendo do tecido estudado. Uma hipótese para essa função dualista seria de que as sirtuínas, uma vez ativadas ou hiper-expressas, teriam atividade protetora contra o câncer por promoverem a longevidade. As SIRTs mediarão este efeito protetor, limitando a vida replicativa, protegendo contra danos ao DNA e estresse oxidativo (SAUNDERS; VERDIN, 2007). Considerando que incidência da maioria dos cânceres aumenta com a idade após um acúmulo de mutações podemos considerar que o câncer é uma doença do envelhecimento (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

Em contraste, a perda da expressão, atividade ou regulação da SIRT poderia contornar a senescência replicativa, permitindo que a divisão celular prosseguisse sem o correto reparo do DNA e promovendo acúmulo de mutações e instabilidade genômica levando ao desenvolvimento do tumor. Há também evidências crescentes de que as células tumorais podem tornar-se "viciadas" na hiper-expressão de sirtuína, o que permite rápida proliferação e perda de pontos de verificação para promover a propagação contínua na presença de mutações acumuladas (SAUNDERS; VERDIN, 2007).

2.6.1 Sirtuína 1

A Sirtuína 1 (SIRT1) desacetila lisinas 9 e 14 da histona H3 e a lisina 16 da histona H4, adicionalmente, desacetila a lisina 26 da histona H1, enquanto hidrolisa um molécula de NAD⁺ para cada resíduo de lisina que é desacetilado. As Desacetilases de Histona têm um domínio catalítico, que está altamente conservado em organismos desde bactérias até humanos, composto por dois domínios distintos que se ligam ao NAD⁺ e ao substrato de acetil-lisina, respectivamente. SIRT1, modifica diretamente a cromatina e silencia a transcrição, para modular um *check-point* da meiose, o que leva à um efeito antienvhecimento por aumentar a estabilidade do genoma e suprimir o DNA recombinante. Essas modificações de histonas estão relacionados ao silenciamento de genes e formação de heterocromatina (VOELTER-MAHLKNECHT; MAHLKNECHT, 2006). No entanto, a SIRT1 está envolvida na regulação de vários processos biológicos importantes, incluindo a senescência e longevidade devido à sua capacidade de interagir com outras moléculas além das histonas, incluindo p53 (SAUNDERS; VERDIN, 2007).

Altos níveis de proteína em células jovens em combinação com altos níveis de NAD⁺ leva a uma desacetilação de p53 e proteínas de histonas que promovem longevidade. Desacetilação de histona H1 leva a sua degradação e promove a formação de heterocromatina associada a expressão e diminuição da atividade durante o envelhecimento. Além disso, conduz à sua degradação, que promove a formação de focos heterocromáticos associados à senescência (SAHFs). Em contrapartida, os níveis de proteína Sirt1 estão baixos em células velhas, e altos níveis de NAD⁺ inibem a atividade de Sirt1, e a resultante hiperacetilação de p53 induz senescência da replicação. A ausência de regulação para baixo de Sirt1 durante o envelhecimento pode promover a sobrevivência celular após danos oxidativos, levando à acumulação de mutações, e um risco aumentado de desenvolvimento de câncer (SAUNDERS; VERDIN, 2007).

A desacetilação de substratos não-histonas pela SIRT1 pode ocorrer em: (1) Fatores transcricionais - p53, FOXO1, FOXO3a, NF-κB, c-MYC, N-MYC, E2F1 e HIF-1α/HIF-2α, para regulação da progressão do ciclo celular sob várias condições; (2) Elementos da maquinaria de reparo de DNA - Ku70, RAD51, NBS1, APE1, XPA/C e WRN, para aumentar o reparo de DNA danificado; (3) Receptor nuclear, ciclo circadiano e fatores relacionados - LXR, FXR, ERα, AR, PPARγ, PGC1α, CLOCK, e PER2, para regulação do metabolismo; (4) enzimas modificadoras de histona - SUV39H1, p300, TIP60 e PCAF, para regular a expressão

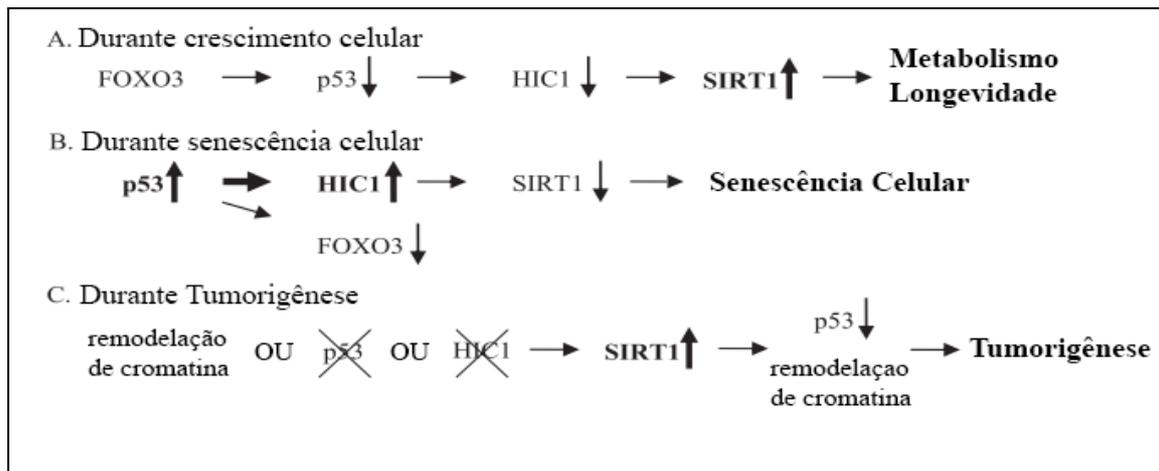
gênica; (5) moléculas sinalizadoras celulares - STAT3, β -catenina e SMAD7 (ROTH; CHEN, 2014).

Um dos mecanismos moleculares pelos quais a SIRT1 aumenta a longevidade celular é sua interação com a família FOXO de fatores de transcrição Forkhead (família de proteínas que tem como função participar do metabolismo da insulina e regular de longevidade). SIRT1 controla a resposta celular ao estresse, em mamíferos, regulando a família FOXO. SIRT1 e FOXO formam complexos nas células em resposta ao estresse oxidativo, onde a SIRT1 desacetila a FOXO3, aumentando a habilidade da FOXO3 de induzir parada de ciclo celular e resistência ao estresse oxidativo, e inibindo a FOXO3 de induzir morte celular (BRUNET et al., 2004).

Recentes estudos revelaram que a SIRT1 está aumentada em linhagens tumorais, sugerindo que a SIRT1 está envolvida na carcinogênese. O p53, um substrato da SIRT, ativa a expressão do supressor tumoral HIC1 (do inglês, *hypermethylated in cancer 1*). HIC1 está diretamente envolvido na regulação de SIRT1, que afeta resposta a dano de DNA. Esses achados sugerem que exista mecanismos complexos de controle, que são modulados por vários sinais celulares. Além disso, SIRT1 regula diversos processos biológicos incluindo restrição calórica, metabolismo, mobilização de gorduras, apoptose, resposta ao estresse e secreção de insulina (LIM, 2006).

Lim, C.S. propôs um modelo hipotético do mecanismo de ação da SIRT1, no qual sob condição normal de crescimento, FOXO3 inibe p53 através de interação direta, falhando em induzir HIC1, o que leva ao estímulo de SIRT1 e conseqüentemente ao aumento do metabolismo e leva à longevidade. Por outro lado, durante a senescência celular p53 está aumentado, induzindo expressão de HIC1. Como resultado, SIRT1 está diminuída levando a senescência celular. Durante a tumorigênese, entretanto, a remodelação defeituosa de cromatina causa mudanças favoráveis em expressão gênica de todo o genoma ou inativação de p53 por mutação ou hipermetilação de HIC1, resultando em aumento irregular de SIRT1, o que leva a promoção da carcinogênese pela inativação de p53 e pela modulação da remodelação de cromatina num contexto independente de p53 (Figura 8) (LIM, 2007).

Figura 8: Modelo hipotético de interação entre SIRT1, p53, HIC1 e FOXO3.



Fonte: LIM (2007)

SIRT1 é a sirtuína mais estudada e está em níveis elevados em vários tipos de tumores como próstata, pele, pulmão e cólon assim como em linhagens celulares de câncer de ovário e mama quimiorresistentes. A SIRT1 tem sido associada a inibição da proliferação e formação tumoral de câncer de cólon e tem sido associada a melhor prognóstico em Carcinoma Espinocelular de Cabeça e Pescoço. Por outro lado, a hiperexpressão de SIRT1 tem sido associada a progressão tumoral e mau prognóstico em câncer de cólon, próstata, linfoma e tumores gastrointestinais (p.ex. carcinoma hepatocelular e gástrico). Em tumores ginecológicos, uma expressão elevada de SIRT1 tem sido vista mais frequentemente em câncer epitelial de ovário que em lesões ovarianas benignas e tem sido associada com quimiorresistência em câncer endometrial e câncer cervical (ROTH; CHEN, 2014).

Experimento mostrou que um Supressor de Metástase Tumoral em Câncer de Mama e outros cânceres (do inglês: *Breast Cancer Metastasis Suppressor 1*- BRSM1) é capaz de interromper a associação endógena de DCB1 (do inglês, *Deleted in Breast Cancer 1*) e SIRT1. DBC1 é identificado como importante regulador negativo de SIRT1 e resposta ao estresse genotóxico. Consequentemente, acetilação de p53 dependente de SIRT também é afetado por BRMS1, sendo este um novo regulador do complexo DBC1-SIRT1 e da desacetilação de p53 dependente de SIRT1 (LIU et al., 2016).

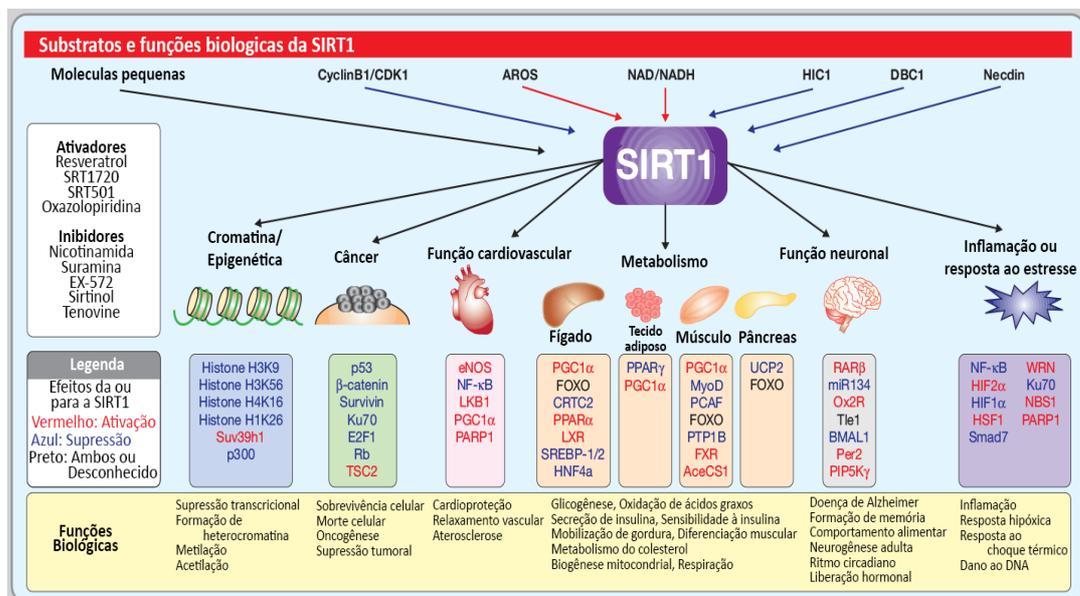
Em amostras teciduais de Câncer de Pulmão de Células Não-pequenas, macrófagos alveolares mostraram fraca ou moderada imunorreatividade para SIRT1 em pulmão normal. A expressão de *SIRT1* correlacionou-se significativamente com sexo feminino ($p=0,017$), tumores indiferenciados ($p=0,017$), estágio T patológico mais elevado ($p=0,013$) e metástases para linfonodos ($p<0,001$) nos tumores invasivos. Em amostras de adenocarcinoma e

carcinoma *in situ*, a positividade para *SIRT1* foi significativamente menor em carcinoma *in situ* comparado à adenocarcinoma invasivo ($p=0,001$). Em conclusão: A expressão de *SIRT1* estava presente em 67% das amostras de carcinoma invasivo e seu nível estava significativamente associado a fatores desfavoráveis clínico-patológicos, que incluíam o estágio T, a metástase para linfonodos e a invasão tumoral mais avançada (NOH et al., 2013).

Em estudo resistência a quimioterapia pré-operatória em câncer de colo de útero localmente avançado (IIIA-IIIB) os níveis de *SIRT1*, observadas por imunohistoquímica, estavam aumentados ($p<0.001$) no grupo que não respondeu à quimioterapia (portanto foram para tratamento com radioterapia) quando comparadas ao grupo que respondeu à quimioterapia neoadjuvante (essas pacientes foram para histerectomia). Desta forma, a *SIRT1* poderia ser considerada um preditor de resposta ao tratamento em câncer de colo de útero localmente avançado (TERAMAE et al., 2015).

Para Carcinoma Cervical Escamoso, observou-se uma progressão no nível de expressão de *SIRT1* das lesões pré-malignas até lesão invasiva, com aumento do valor significativamente estatístico (NIC1 versus NIC2-3, $p=0,01$; NIC 2-3 versus Câncer Cervical, $p=0,0001$), sugerindo que *SIRT1* também poderia funcionar como preditor de progressão de NIC para Câncer Cervical (VELEZ-PEREZ et al., 2016).

Figura 9: Substratos e Funções biológicas da SIRT 1.



Fonte: (NAKAGAWA; GUARENTE, 2011).

2.6.2 Sirtuína 3

A SIRT3 é uma desacetilase de histona primariamente mitocondrial, que determina acetilação de várias proteínas mitocondriais. Portanto, ela tem papel importante em vários eventos celulares como metabolismo de nutrientes, balanço de ATP e regulação da maquinaria antioxidante. A proteína SIRT3 é composta por dois domínios funcionais, onde o domínio maior Rossmann possui locais para ligação de NAD⁺, e o domínio menor liga-se a átomos de zinco. A fenda entre os domínios serve como encaixe para acetilação dos substratos. A SIRT3 é expressa no citoplasma como um precursor inativo de 399 aminoácidos (44 kDa), sendo subsequentemente enviado para a mitocôndria, onde é clivado na região N-terminal pela proteína peptidase mitocondrial para gerar uma proteína de 28-kDa com 257 aminoácidos. O tráfico mitocondrial depende de uma região N-terminal de 100 aminoácidos, cujos resíduos 1-25 têm um papel importante tanto na localização mitocondrial quanto no processamento proteolítico. A desregulação da SIRT3 está envolvida no desenvolvimento de doenças como diabetes, injúria mitocondrial (XIONG et al., 2016).

No câncer, a SIRT3 tem papel conflitante na iniciação e na progressão de câncer, e as vias envolvidas nesse processo não são completamente conhecidas. Um dos mecanismos principais da supressão tumoral exercida pela SIRT3 é através da modulação (inativação) de ROS via ativação de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase que é uma das mais importantes enzimas detoxificadoras mitocondriais. SIRT3 também reduz ROS pela deacetilação e ativação da isocitrato dehidrolase 2, o que aumenta os níveis NADPH e glutathione.

A desacetilação e ativação de FOXO3a pela SIRT3 também promove a ativação de enzimas antioxidantes (ROTH; CHEN, 2014). A SIRT3, como proteína oncogênica, foi observada e muitos níveis correlacionando-se com marcadores de malignidade e prognóstico desfavorável em esôfago (ZHAO et al., 2013), assim como a prognóstico ruim em pacientes com câncer de mama grau3 (TORRENS-MAS et al., 2016).

Já baixos níveis de SIRT3 aumenta a eficácia de cisplatina e tamoxifeno, drogas usadas no tratamento do câncer de mama (TORRENS-MAS et al., 2016); e inibe a proliferação celular, reduz a atividade tumoral e sensibiliza as células à radiação ou quimioterapia em câncer escamoso de cavidade oral (ALHAZZAZI et al., 2011b). Análises imunohistoquímicas de câncer de tireóide demonstraram que o nível de SIRT3 está baixa em tecido tireoidiano normal, moderadamente alto em câncer folicular e em altos níveis em

carcinoma papilar (SHACKELFORD et al., 2013). Além disso, a expressão de SIRT3 está marcadamente elevada em melanoma, e sua inibição reduz proliferação, formação de colônias e migração celular e induz senescência e parada de ciclo celular em G1 em células humanas de melanoma, com consequente aumento na expressão de ciclina D1 e E1 (GEORGE et al., 2016).

No papel de supressor tumoral, a SIRT3 inibe a proliferação, a reprogramação metabólica e outros fenótipos malignos das células e correlaciona-se com bom prognóstico em vários tipos de câncer. A expressão de SIRT3 está marcadamente diminuída em células de câncer de mama quando comparada com tecido mamário normal. E uma menor expressão de SIRT3 está associada a uma menor sobrevida livre de progressão loco-regional (DESOUKI, 2014).

Também observou-se que a SIRT3 leva à inibição da glicólise e reverte a reprogramação metabólica das células de câncer de mama (WEI et al., 2013). Em câncer hepatocelular, a expressão de SIRT3 é bastante menor no tecido tumoral que no tecido adjacente não-tumoral, e altos níveis de SIRT3 correlacionam-se com aumento de sobrevida global e sobrevida livre de progressão (ZHANG et al., 2012). Em adição, altos níveis de SIRT3 inibe o crescimento e induz apoptose em células de hepatocarcinoma, aumentando sua sensibilidade a agentes quimioterápicos; enquanto que baixos níveis de SIRT3 estão associado a parâmetros clínico-patológicos desfavoráveis como diferenciação estadiamento clínico (WANG et al., 2014).

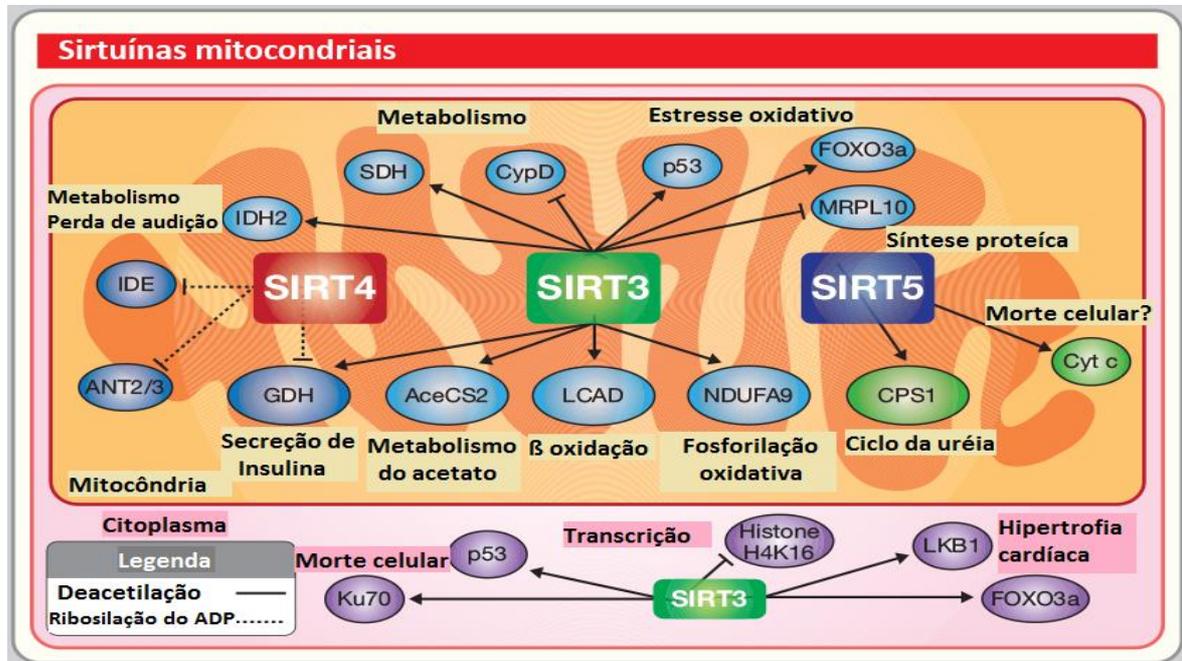
Em câncer de pâncreas, uma menor expressão de SIRT3 correlaciona-se com maior agressividade e menor tempo para progressão (MCGLYNN et al., 2015). Em malignidades de células B a expressão de SIRT3 em amostras é menor que em linfócitos B de doadores saudáveis, e menores níveis de SIRT3 prediz um pior prognóstico (YU et al., 2016).

2.6.3 Sirtuína 5

O gene da SIRT5 humano está localizado no braço curto do cromossomo 6(6p23,13), sendo uma sirtuína mitocondrial incomum pois possui não apenas atividade de Deacetilase dependente de NAD⁺ mas também de Deacilase (deamonilase e dessucinilase). O substrato mais estudado de SIRT5 é a CPS1 (do inglês: *carbamoyl phosphate synthetase 1*) enzima que catalisa o primeiro passo (limitante de velocidade) da síntese de uréia. Vários grupos têm demonstrado que SIRT5 pode deacetilar, deamonilar e dessussinilar a CPS1. A deacetilação

de CPS1 ativa sua atividade de enzima e promove a produção de uréia e a retirada de amônia da célula (Figura 10) (ROTH; CHEN, 2014).

Figura 10: Funções das Sirtuínas Mitocondriais.



FONTE: Nakagawa; Guarente (2011).

Curiosamente, o SIRT5 também contribui para o metabolismo do nitrogênio, indicando que as sirtuínas mitocondriais atuam juntas modificando a rede metabólica mitocondrial em diferentes pontos. Verificou-se também que a SIRT5 desacetila o Citocromo C, podendo assim participar da regulação da apoptose, mas também da modulação de função desta proteína na respiração (Figura 10) (VASSILOPOULOS et al., 2011).

A SIRT5 é a sirtuína menos estudada em câncer e, como as SIRT1 e SIRT3, parece ter papel dual na carcinogênese. Em estudo que analisou 39 amostras de câncer de pulmão não pequenas células, a SIRT5 estava hiperexpressa (em níveis de mRNA e proteínas) em câncer de pulmão quando comparado a amostras de tecido adjacente pulmonar normal. Sua maior expressão foi associada a taxas menores de sobrevida global e sobrevida livre de progressão. O alto nível de expressão também esteve associado a maior volume tumoral e maior estadiamento de doença. Os pesquisadores relacionaram o nível de expressão de SIRT5 com nível de expressão de NRF2 (fator transcricional envolvido em câncer de pulmão) nas amostras. Foi realizada análise por regressão linear para testar se os níveis de mRNA de NRF2 estavam relacionados aos de SIRT5. Interessantemente, o nível de mRNA estava

significativamente e positivamente correlacionado com os níveis de mRNM de *NRF2*, sugerindo que esta pode ser uma das vias de carcinogênese da *SIRT5*(LU et al., 2014).

Em estudo com 71 amostras de câncer de mama, a expressão de *SIRT5* estava significativamente aumentada quando comparada com o tecido mamário adjacente, sugerindo que *SIRT5* pode ter uma papel na carcinogênese mamária (IGCI et al., 2016). Já em câncer de endométrio, reportou que o nível de expressão de *SIRT5* estava significativamente menor em nas amostras de câncer quando comparadas com controles uterinos normais (BARTOSCH et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os níveis de expressão de *SIRT1*, *SIRT3* e *SIRT5* em amostras frescas de câncer de colo de útero e correlacionar com variáveis epidemiológicas e anatomopatológicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar amostras de tecidos de câncer cervical de pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da UFPE;
- Determinar os níveis de expressão gênica de *SIRT1*, *SIRT3* e *SIRT5* por PCR quantitativa em tempo real;
- Correlacionar os dados obtidos com as variáveis epidemiológicas e anatomopatológicas;
- Comparar os níveis de expressão gênica dos genes estudados em câncer cervical com dados obtidos de amostras de células cervicais sem lesão.

4 METODOLOGIA

4.1 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS E ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA

A ressecção e biópsia das espécies foram coletadas de pacientes diagnosticadas com câncer cervical de 22 mulheres que não haviam recebido nenhum tratamento prévio com radioterapia ou quimioterapia, após preenchimento de Termo de Consentimento Livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/CCS/UFPE: 275/08).

Os dados epidemiológicos e anatomopatológicos foram obtidos através de entrevistas com as pacientes no momento da realização da biópsia tumoral e preenchimento pelo médico do formulário. Os casos foram estadiados conforme o *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO), que são sistemas de estadiamento internacionais utilizados amplamente. Todas as amostras de tecido foram armazenadas em TRIzol® Reagent (Life Technologies, USA) e mantidas no freezer a -80°C até ser realizada a extração de RNA.

A patologia (as secções teciduais tingidas com hematoxilina eosina) foram avaliadas por patologistas independentes e não revisada por patologista central. Os cânceres cervicais foram classificados histologicamente em Grau 1: bem diferenciado; Grau 2: medianamente diferenciado; e Grau 3: mal indiferenciado.

4.2 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA das amostras foi extraído seguindo o protocolo do TRIzol® Reagent (Life Technologies, USA). Cada amostra usada tinha entre 50-100 mg de tecido do colo uterino, ao qual foi adicionado 1mL de Trizol e o tecido foi macerado com pistilo. O material foi incubado à temperatura ambiente durante 5 minutos, permitindo a total dissociação do complexo de núcleo-proteínas, e posteriormente adicionado 0,2 mL de clorofórmio e encubado por 3 minutos. Posteriormente foi centrifugado por 15 minutos a uma velocidade de 14000 rpm e 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde se adicionou 0,5mL de isopropanol permitindo a precipitação do RNA. Após encubação por 10 minutos foi centrifugado por mais 10 minutos a 14000 rpm e 4°C. O pellet formado foi recuperado e ressuspenso em 75% etanol. Após uma breve agitação no vórtex foi centrifugado por 5 minutos, 8000 rpm e 4°C. o sobrenadante foi descartado e após secagem do pellet à temperatura ambiente, este foi ressuspenso em 50µL de água RNase-free.

4.3 TRANSCRIÇÃO REVERSA E PCR QUANTITATIVO (QPCR)

Para acessar os níveis de expressão de *SIRT1*, *SIRT3* e *SIRT5*, o DNA complementar (cDNA) foi produzido de mRNA extraído utilizando o QuantiNova Reverse Transcription Kit® (Qiagen, USA), seguindo instruções do fabricante. Todas as amostras foram estudadas por duplicatas e o gene constitutivo *RPLP0* foi utilizado como gene de referência. As sequências dos oligonucleotídeos para o experimento são: ***RPLP0*** (5'- GCA GAC AGA CAC TGG CAA CAT T-3' 3'-TCT ACA ACC CTG AAG TGC TTG ATA TC-5'); ***SIRT1*** (5' – GTT TCA TGA TGA CAA GCG GTT C- 3' 3'- GTC ATG GTT CCT TTG CAA CAG -5'); ***SIRT3*** (5'- GGA GAT CGT ACT GCT GGA G -3' 3'- CTG CAG GAT GTA GCT GAG C-3'); ***SIRT5*** (5'- ATA CCT GCC TCA GAA TTT CCT C - 3' 3'- AAT GGA AGA GTG GTT GG-5'). Nos experimentos de expressão gênica foram usados 10uL QuantiNova Sybr Green RT-PCR, 1,4uL do primer, 7,6uL de água e 1uL da amostra do cDNA, com a programação de: 95°C 2min, 40 ciclos de 95°C por 5s e 62°C por 10s.

As curvas de dissociação foram geradas para garantir que apenas um produto foi amplificado (*melting curve*). A expressão gênica foi analisada através do ΔC_t e sua comparação entre os grupos foi realizada através do $\Delta\Delta C_t$ utilizando 43 amostras controles disponíveis no laboratório. Os valores foram demonstrados graficamente a partir do cálculo de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ no qual valores maiores que 1 demonstram genes hiperexpressos (*up-regulated*) e valores abaixo de 1 demonstram genes hipoexpressos (*down-regulated*) para os genes *SIRT1* e *SIRT5*, uma vez que *SIRT3* não apresentou expressão nas células cervicais normais.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita utilizando o programa GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Software, CA). O teste Chi-square e Exato de Fisher foi usado para analisar os dados demográficos; ANOVA One-Way e teste t-Student foram feitos para investigar a significância da hipótese. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

Um total de 22 mulheres foram incluídas no estudo, das quais 20 possuíam subtipo histológico de Câncer Cervical Escamoso e duas apresentaram o subtipo Adenocarcinoma. Quatro pacientes (18%) tinha mais de 50 anos ao diagnóstico, enquanto 18 pacientes tinham menos de 50 anos (81,8%). Das 17 pacientes cujos laudos anatomopatológicos referiam o grau histológico, três pacientes tinham tumores grau 1; 11 pacientes referiam grau 2 e 03 pacientes possuíam tumores grau 3. As características epidemiológicas e anatomopatológicas estão apresentadas na Tabela 3.

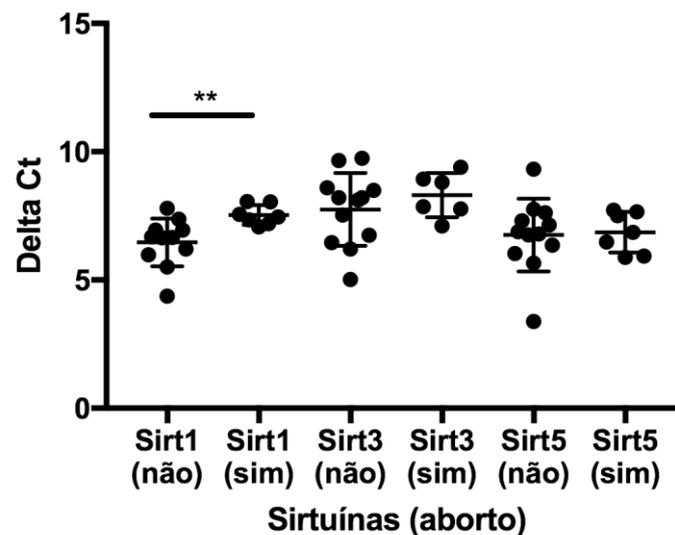
Tabela 3. Dados Epidemiológicos e Anatomopatológicos

FATORES		Número (%)
Idade		
	≤ 50 anos	18 (81,8)
	> 50 anos	04 (18,1)
Tipo histológico		
	Carcinoma epidermóide	20 (90,9)
	Adenocarcinoma	2 (9,1)
Grau Histológico		
	1	03 (13,6)
	2	11 (50)
	3	03 (13,6)
Estadiamento		
	I	4 (18,1)
	II	3 (13,6)
	III	11 (50)
	IV	4 (18,1)
Índice De Massa Corpórea		
	Magreza	01 (4,5)
	Normal	09 (40,9)
	Obesidade grau 1	03 (13,6)
	Obesidade grave	01 (4,5)
Paridade		
	0-2	10 (45,5)
	≥ 3	12 (54,5)
Abortos		
	Sim	7 (31,8)
	Não	15 (68,1)
Nº de parceiros		
	≤ 5	17 (77,2)
	> 5	3 (13,6)
Tabagismo		
	Sim	5 (22,7)
	Não	17 (77,27)
Uso de Álcool		
	Sim	08 (36,3)
	Não	14 (63,6)

A análise de expressão gênica foi realizada nas amostras obtidas das 22 pacientes. No entanto, 3 amostras (subtipo carcinoma epidermóide) foram excluídas do estudo, uma vez que não apresentaram amplificação para nenhum dos genes.

Em relação à expressão de acordo com o histórico de aborto relatado pelo paciente, observou-se diferença estatisticamente significativa (quando a mulher tinha sofrido ao menos um aborto espontâneo *versus* nunca abortou) com menores níveis de expressão de *SIRT1* em pacientes que já sofreram aborto ($p=0,0038$). Nenhuma correlação foi encontrada para as *SIRT3* e *SIRT5*, apresentando um mesmo perfil de expressão em ambos os grupos (Figura 11).

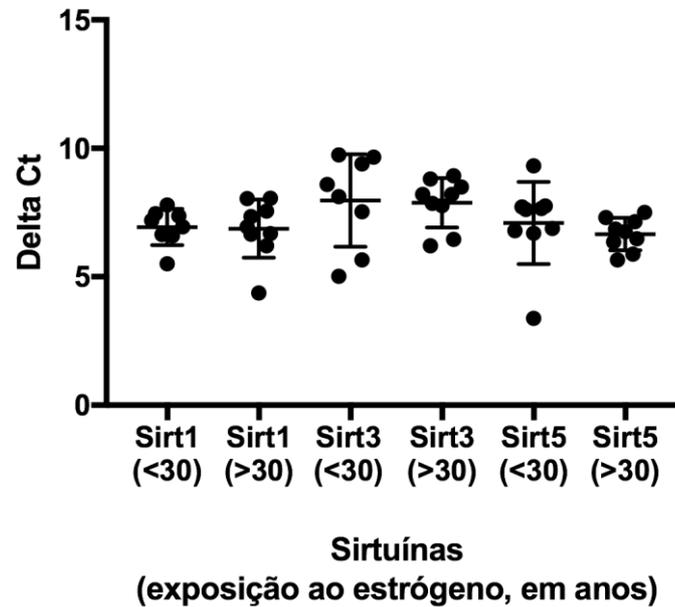
Figura 11: Análise de expressão gênica de *SIRT1*, *SIRT3* e *SIRT5* de acordo a ocorrência de aborto.



Fonte: Dados da pesquisa

O efeito hormonal sobre a expressão das sirtuínas foi observado através da análise do número de anos de exposição a hormônios sexuais femininos (idade do diagnóstico do câncer subtraída da idade da menarca). As mulheres com mais de 30 anos de exposição a hormônios tinham níveis mais altos de expressão *SIRT5*. Neste caso, houve uma tendência a diferença de expressão de *SIRT5* nos dois grupos mas não foi significativa ($p=0,093$) (Figura12).

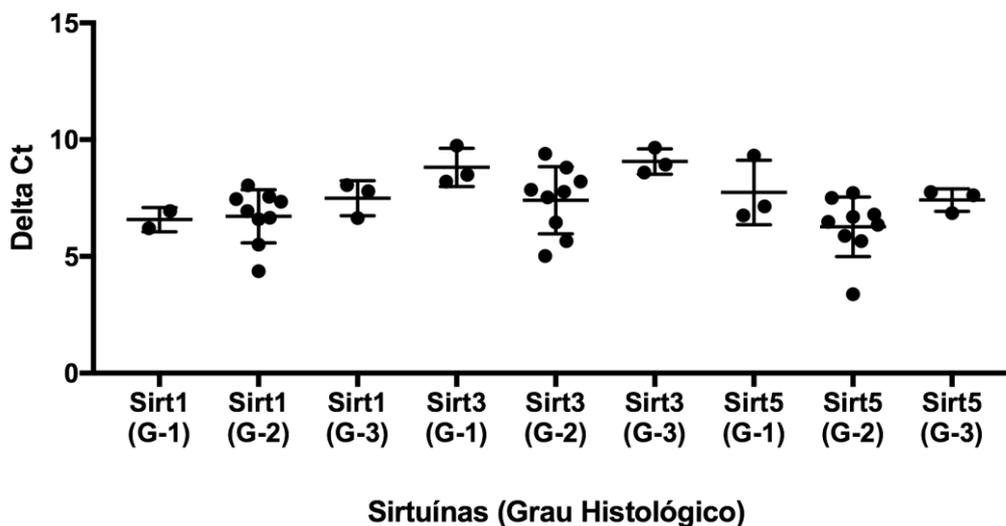
Figura 12: Análise de expressão gênica de *SIRT1*, *SIRT3* e *SIRT5* de acordo o tempo de exposição ao estrógeno desde a menarca até o momento do diagnóstico de câncer cervical.



Fonte: Dados da pesquisa

Foi encontrada tendência a diferença entre os níveis de expressão de *SIRT3* e *SIRT5* e os graus histológicos tumorais ($p=0,052$ e $p=0,069$, respectivamente). Foi observado um maior nível de expressão de *SIRT3* no grau 2 que no grau 3 ($p=0,0636$), da mesma forma que com *SIRT5* ($p=0,0636$) (Figura 13).

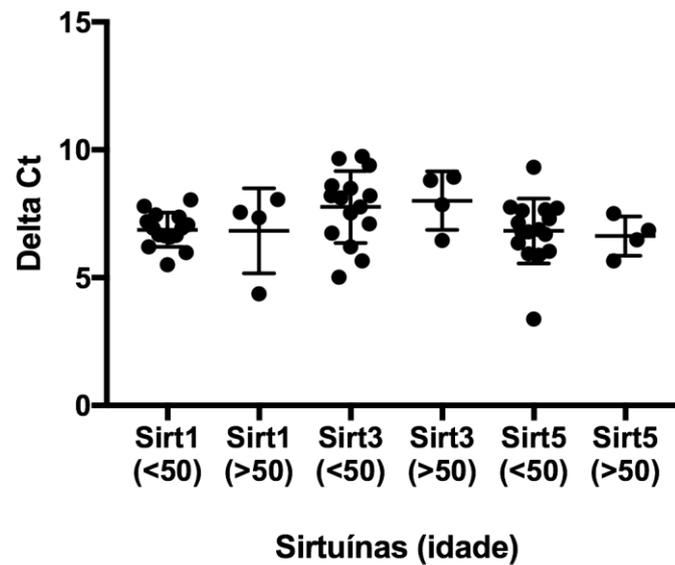
Figura 13: Análise de expressão gênica de *SIRT1*, *SIRT3* e *SIRT5* de acordo o grau histológico.



Fonte: Dados da pesquisa

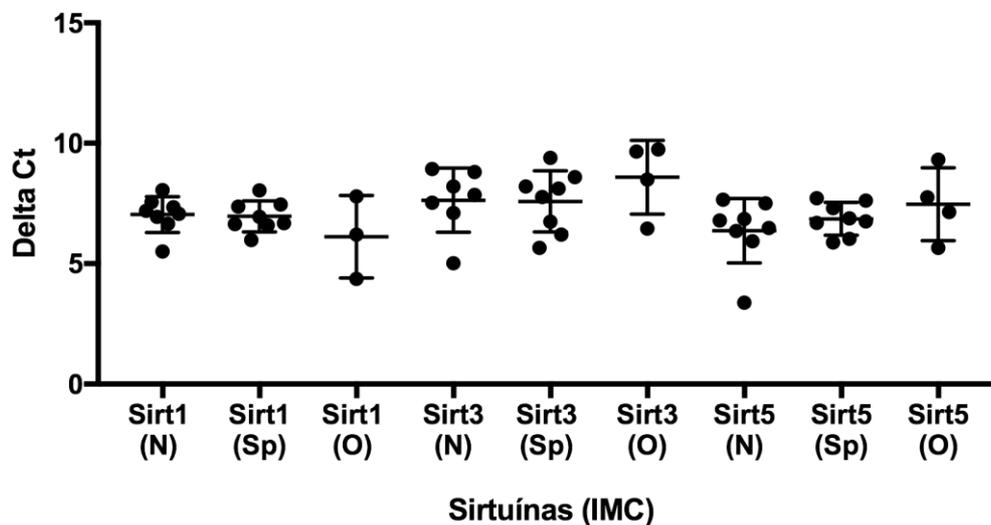
Para as variáveis idade, tabagismo, IMC (índice de massa corpórea), uso de álcool e estadiamento não foram encontradas diferenças estatísticas entre nível de expressão das *SIRT1*, *3* e *5* (Figuras 14, 15, 16 e 17).

Figura 14: Análise de expressão gênica de *SIRT1*, *SIRT3* e *SIRT5* de acordo a idade da paciente no momento do diagnóstico de câncer cervical.



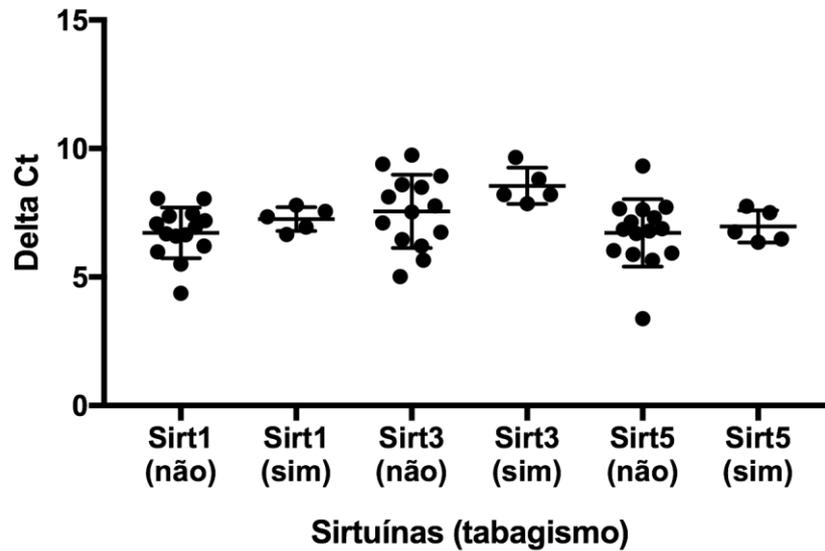
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 15: Análise de expressão gênica de *SIRT1*, *SIRT3* e *SIRT5* de acordo os níveis de IMC como Normal (N), Sobrepeso (Sp) e Obeso (O).



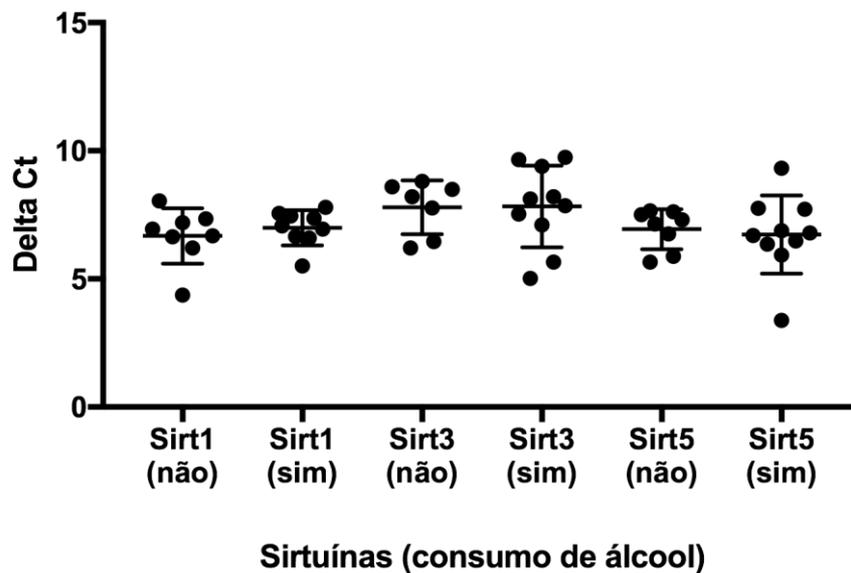
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 16: Análise de expressão gênica de *SIRT1*, *SIRT3* e *SIRT5* de acordo com o relato de tabagismo.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 17: Análise de expressão gênica de *SIRT1*, *SIRT3* e *SIRT5* de acordo consumo de álcool.

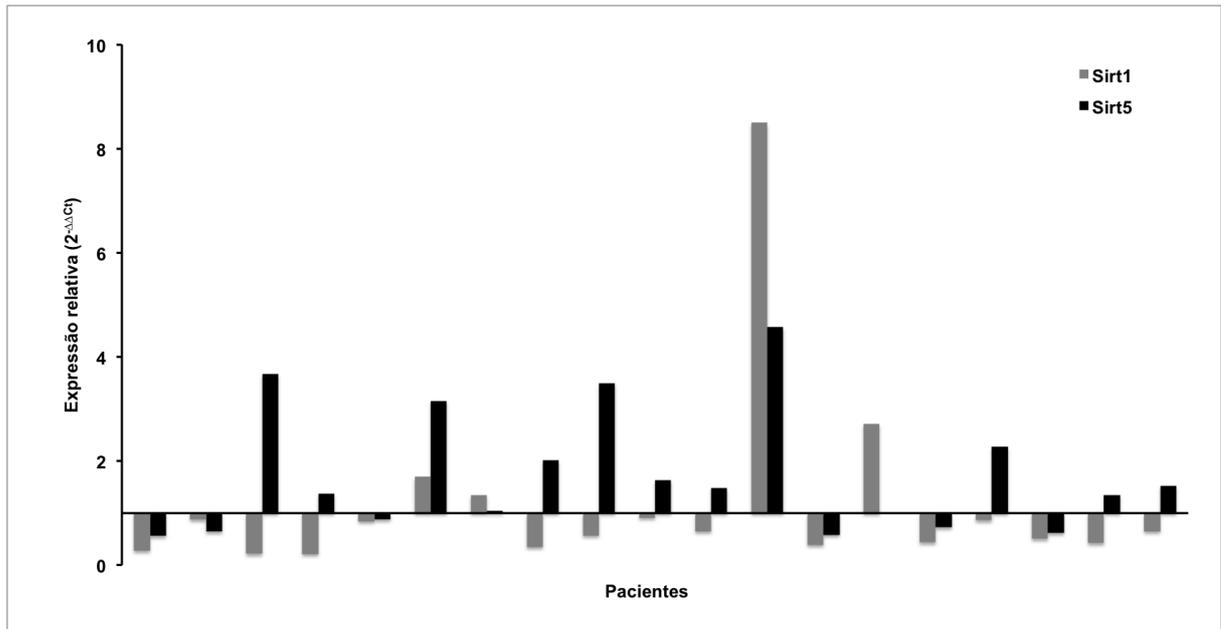


Fonte: Dados da pesquisa

Um total de 79% das amostras de câncer cervical analisadas apresentaram hipoxpressão para *SIRT1* em relação às células cervicais normais, enquanto o oposto foi observado para *SIRT5*, onde encontramos que 72% das amostras tumorais tinham o gene

hiperexpresso, numa variação que chegou a 4,5 vezes mais quando comparado à expressão de nas células cervicais normais (Figura 18). Não foi possível realizar análise para a expressão relativa de *SIRT3* uma vez que não foi detectada expressão em células cervicais normais.

Figura 18: Expressão relativa de *SIRT1* e *SIRT5* entre amostras tumorais e normais, por paciente.



Fonte: Dados da pesquisa

6 DISCUSSÃO

O papel das SIRT1s na carcinogênese ainda não está claro, com evidências que demonstram promoção tumoral e supressão tumoral, dependendo do tecido estudado (SAUNDERS; VERDIN, 2007). Em tecido cervical, poucos estudos foram realizados em relação ao papel da sirtuínas, assim como o seu papel na infecção pelo HPV.

Em estudos de longevidade, a SIRT1 é responsável pela modificação da cromatina e silenciamento da transcrição, modulando um *check-point* da meiose (VOELTER-MAHLKNECHT; MAHLKNECHT, 2006). Além disso, baixos níveis de proteína SIRT1 podem promover a sobrevivência celular após danos oxidativos, podendo levar à câncer (SAUNDERS; VERDIN, 2007). No nosso estudo, o papel oposto seria observado no desenvolvimento fetal, no qual mulheres que tinham histórico de aborto apresentaram menores níveis expressão de SIRT1 em relação às mulheres que nunca haviam abortado. Além disso, Zhao, *et al*, reportaram que a expressão ineficiente de SIRT3 reduz número de cópias de DNA mitocondrial e biogênese e, portanto, impede o desenvolvimento competente de oócitos humanos gerados por fertilização *in vitro*, desta forma sugerindo que as sirtuínas podem estar relacionadas à embriogênese (ZHAO et al., 2016).

Adicionalmente, dados recentes de sugerem que a presença de HPV no trato genital feminino está relacionada a maior taxa de abortamento (AMBUHL et al., 2016), podendo estar relacionado à uma associação da SIRT1 com HPV. Langsfeld *et al*. observou um declínio nos níveis de proteína SIRT1 à medida que a diferenciação prosseguia em queratinócitos normais, no entanto, em células contendo HPV31 ou 16 de alto risco, os níveis de proteína SIRT1 permaneceram elevados ao longo da diferenciação. Isto demonstra que o HPV promove a manutenção de níveis elevados de SIRT1 ao longo da diferenciação e sugere um potencial papel no ciclo de vida viral (LANGSFELD; BODILY; LAIMINS, 2015). Tais dados sugerem que uma maior frequência de abortamento pode estar relacionada não apenas presença do HPV, mas também a desregulação de SIRT1 resultante da atividade viral prolongada.

Células do câncer cervical apresentaram nesse trabalho o gene SIRT1 hiporregulado, o que foi de encontro ao resultados reportados por Velez-Perez, que apresentou um maior nível de SIRT1 em amostras de câncer cervical comparado ao controle, por imunohistoquímica (VELEZ-PEREZ et al., 2016). Porém, um outro estudo verificou que existe um padrão heterogêneo (variação de baixo para alto) de nível de SIRT1 identificadas por imunohistoquímica (SINGH; KUMAR; THAKUR, 2015), o que demonstra que existem

fatores que levam a interferência nos níveis de SIRT1 que ainda precisam ser evidenciados. Além disso, a diferença do perfil de expressão da SIRT1 nos estudos pode estar relacionada à metodologia aplicada, uma vez que os níveis de mRNA e proteína podem não ser diretamente proporcionais.

A SIRT5 é a sirtuína menos estudada em câncer, tendo sido observada em níveis aumentados em câncer de pulmão (LU et al., 2014) e câncer de mama (IGCI et al., 2016), enquanto demonstrou estar em níveis reduzidos em câncer de endométrio (BARTOSCH et al., 2016). Nas amostras cervicais estudadas, observou-se uma hiperexpressão de SIRT5 em 72% das amostras tumorais em comparação às células cervicais normais, o que poder estar associado a maior volume tumoral e maior estadiamento da doença além de menores taxas de sobrevida global e sobrevida livre de progressão, como foi observado para o câncer de pulmão. Estudos adicionais devem ser realizados para comprovar esta hipótese em câncer cervical e determinar o potencial da SIRT5 como um biomarcador prognóstico da doença.

Há evidências na literatura que o receptor de estrogênio (ER α) interage fisicamente e coopera funcionalmente com SIRT1 na estimulação de células tumorais mamárias (CHALOVICH; EISENBERG, 2005). Logo, a inibição de SIRT1 conduz à inibição da sinalização mediada por ER, indicando assim que SIRT1 pode atuar como um co-ativador de ER (WEN et al., 2007). Nesse estudo, não foi possível observar correlação da expressão de SIRT1 com o tempo de exposição ao estrógeno nas amostras de câncer cervical. No entanto, observou-se uma tendência de correlação dos níveis de expressão de SIRT5 em relação ao tempo de exposição ao estrogênio. Existem dados na literatura mostrando que ER α exerce seu controle no metabolismo via regulação da expressão de SIRT5 que influencia o consumo de oxigênio e a geração ATP (RANHOTRA, 2015).

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados neste trabalho contribuem de forma significativa para a elucidação do papel das sirtuínas no câncer cervical. Foi observada alteração nos níveis de expressão das sirtuínas 1 e 5, encontrando-se com hipoexpresso e hiperexpresso, respectivamente. Indicando possível utilização destes níveis de expressão como biomarcadores do desenvolvimento de câncer cervical.

A expressão da SIRT1 em células cervicais foi significativamente relacionada com ocorrência de aborto. Estudo prévio identificou o papel da sirtuína 3 em melhorar a competência de oócitos gerados por fertilização *in vitro*. Os resultados aqui apresentados poderão servir de base para novas prospecções na área de reprodução humana.

Foi identificado uma tendência de que a SIRT5 esteja hiperexpressa em mulheres com maior tempo de exposição ao estrógeno. Em outros tipos de câncer, como o de mama esta correlação foi associada a carcinogênese. Estudos adicionais serão necessários para considerar esta variável e relacionar como fatores prognósticos e preditivos.

A principal perspectiva deste trabalho é que com o aumento do número de amostras continuar o estudo da expressão de SIRT 1, 3 e 5. Ao final das análises os dados serão compilados para publicação em periódico de alto impacto.

REFERÊNCIAS

- ALHAZZAZI, T. Y. et al. SIRT3 and cancer: Tumor promoter or suppressor? **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1816, n. 1, p. 80–88, 2011a.
- ALHAZZAZI, T. Y. et al. Sirtuin-3 (SIRT3), a novel potential therapeutic target for oral cancer. **Cancer**, v. 117, n. 8, p. 1670–1678, 2011b.
- AMBUHL, L. M. M. et al. Human Papillomavirus Infection as a Possible Cause of Spontaneous Abortion and Spontaneous Preterm Delivery. **Infectious diseases in obstetrics and gynecology**, v. 2016, p. 3086036, 2016.
- ANTINORE, M. J. et al. The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. **The EMBO journal**, v. 15, n. 8, p. 1950–60, 1996.
- BARTOSCH, C. et al. Assessing sirtuin expression in endometrial carcinoma and non-neoplastic endometrium. **Oncotarget**, v. 7, n. 2, p. 1144–54, 2016.
- BAUDU, A. et al. Prevalence and risk factors of human papillomavirus infection types 16/18/45 in a cohort of French females aged 15-23years. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 4, n. 1, p. 35–43, 2014.
- BODILY, J. M.; MEYERS, C. Genetic Analysis of the Human Papillomavirus Type 31 Differentiation-Dependent Late Promoter Genetic Analysis of the Human Papillomavirus Type 31 Differentiation-Dependent Late Promoter. **Journal of virology**, v. 79, n. 6, p. 3309–3321, 2005.
- BORNSTEIN, J. et al. 2011 Colposcopic Terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. **Obstetrics & Gynecology**, v. 120, n. 1, p. 166–172, 2012.
- BRUNET, A. et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 303, n. 5666, p. 2011–5, 2004.
- BURK, R. D.; CHEN, Z.; VAN DOORSLAER, K. Human papillomaviruses: Genetic basis of carcinogenicity. **Public Health Genomics**, v. 12, n. 5–6, p. 281–290, 2009.
- CHALOVICH, J. M.; EISENBERG, E. SIRT1 is essential for oncogenic signaling by estrogen/estrogen receptor α in breast cancer. **Biophysical Chemistry**, v. 257, n. 5, p. 2432–2437, 2005.

- CHAN, W.; KLOCK, G.; BERNARD, H. Progesterone and Glucocorticoid Response Elements Occur in the Long Control Regions of Several Human Papillomaviruses Involved in Anogenital Neoplasia. **Journal of virology**, v. 63, n. 8, p. 3261–3269, 1989.
- DESOUKI, M. M. AL. Decreased Mitochondrial SIRT3 Expression is Potential Molecular Biomarker Associated with Poor Outcome in Breast Cancer. **Hum Pathol.**, v. 45, n. 5, p. 1071–1077, 2014.
- DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 110, n. 5, p. 525–41, 2006.
- E. MICHISHITA , J. PARK, J. B. ET AL. Evolutionarily Conserved and Nonconserved Cellular Localizations and Functions of Human SIRT Proteins. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, p. 4623–4635, 2005.
- EGAWA, N. et al. Human papillomaviruses; Epithelial tropisms, and the development of neoplasia. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3863–3890, 2015.
- FARKAS, S. A. et al. Genome-wide DNA methylation assay reveals novel candidate biomarker genes in cervical cancer. **Epigenetics**, v. 8, n. 11, p. 1213–1225, 2013.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239–247, 2000.
- FINNEN, R. L. et al. Interactions between Papillomavirus L1 and L2 Capsid Proteins Interactions between Papillomavirus L1 and L2 Capsid Proteins. **Society**, v. 77, n. 8, p. 4818–4826, 2003.
- FLORIN, L. et al. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. **Journal of virology**, v. 76, n. 19, p. 10009–14, 2002.
- GEORGE, J. et al. Pro-Proliferative Function of Mitochondrial Sirtuin Deacetylase SIRT3 in Human Melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 4, p. 809–818, 2016.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HARRIS, C. P. et al. Comprehensive Molecular Cytogenetic Characterization of Cervical Cancer Cell Lines. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 36, n. July 2002, p. 233–241, 2003.
- HOLMGREN, S. C. et al. The Minor Capsid Protein L2 Contributes to Two Steps in the Human Papillomavirus Type 31 Life Cycle The Minor Capsid Protein L2 Contributes to Two

- Steps in the Human Papillomavirus Type 31 Life Cycle. **Journal of virology**, v. 79, n. 7, p. 3938–3948, 2005.
- IGCI, M. et al. High-throughput screening of Sirtuin family of genes in breast cancer. **Gene**, v. 586, n. 1, p. 123–128, 2016.
- KIM, K. et al. Methylation Patterns of Papillomavirus DNA , Its Influence on E2 Function , and Implications in Viral Infection Methylation Patterns of Papillomavirus DNA , Its Influence on E2 Function , and Implications in Viral Infection. **Journal of virology**, v. 77, n. 23, p. 12450–12459, 2003.
- LANGSFELD, E. S.; BODILY, J. M.; LAIMINS, L. A. The Deacetylase Sirtuin 1 Regulates Human Papillomavirus Replication by Modulating Histone Acetylation and Recruitment of DNA Damage Factors NBS1 and Rad51 to Viral Genomes. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 9, p. 1–21, 2015.
- LIM, C. S. SIRT1: Tumor promoter or tumor suppressor? **Medical Hypotheses**, v. 67, n. 2, p. 341–344, 2006.
- LIM, C. S. Human SIRT1: A potential biomarker for tumorigenesis? **Cell Biology International**, v. 31, n. 6, p. 636–637, 2007.
- LIN, H. et al. Genome-wide analysis of aberrant gene expression and methylation profiles reveals susceptibility genes and underlying mechanism of cervical cancer. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 207, p. 147–152, 2016.
- LIU, X. et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 modulates SIRT1-dependent p53 deacetylation through interacting with DBC1. **American Journal of Cancer Research**, v. 6, n. 6, p. 1441–1449, 2016.
- LU, W. et al. SIRT5 facilitates cancer cell growth and drug resistance in non-small cell lung cancer. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 35, n. 11, p. 10699–10705, 2014.
- MADISON, K. C. Barrier function of the skin: “La Raison d’Être” of the epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 2, p. 231–241, 2003.
- MAGLENNON, G. A.; MCINTOSH, P.; DOORBAR, J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. **Virology**, v. 414, n. 2, p. 153–163, 2011.
- MASTERSON, P. J. et al. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1

- protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. **J Virol**, v. 72, n. 9, p. 7407–7419, 1998.
- MCGLYNN, L. M. et al. SIRT3 & SIRT7: Potential Novel Biomarkers for Determining Outcome in Pancreatic Cancer Patients. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0131344, 2015.
- MEI, Z. et al. Sirtuins in metabolism, DNA repair and cancer. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, v. 35, n. 1, p. 182, 2016.
- MIDDLETON, K. et al. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. **Journal of virology**, v. 77, n. 19, p. 10186–201, 2003.
- NACIONAL, I. et al. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA O RASTREAMENTO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO**. [s.l: s.n.].
- NAKAGAWA, T.; GUARENTE, L. Sirtuins at a glance. **Journal of cell science**, v. 124, n. Pt 6, p. 833–838, 2011.
- NGUYEN, M. L. et al. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. **Journal of virology**, v. 77, n. 12, p. 6957–64, 2003.
- NOH, S. J. et al. Expression of SIRT1 and cortactin is associated with progression of non-small cell lung cancer. **Pathology Research and Practice**, v. 209, n. 6, p. 365–370, 2013.
- PINTO, Á. P.; TULIO, S.; CRUZ, O. R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 1, p. 73–78, 2002.
- PYEON, D. et al. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 2, 2009.
- RANHOTRA, H. S. The orphan estrogen-related receptor alpha and metabolic regulation: new frontiers. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 0, n. 0, p. 1–4, 2015.
- ROTH, M.; CHEN, W. Y. Sorting out functions of sirtuins in cancer. **Oncogene**, v. 33, n. 13, p. 1609–20, 2014.
- SAUNDERS, L. R.; VERDIN, E. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. **Oncogene**, v. 26, n. 37, p. 5489–5504, 2007.
- SCHIFFMAN, M. et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews**

Disease Primers, v. 2, p. 16086, 2016.

SCOTTO, L. et al. Identification of Copy Number Gain and Overexpressed Genes on Chromosome Arm 20q by an Integrative Genomic Approach in Cervical Cancer : Potential Role in Progression. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 47, n. January, p. 755–765, 2008.

SHACKELFORD, R. et al. Nicotinamide phosphoribosyltransferase and SIRT3 expression are increased in well-differentiated thyroid carcinomas. **Anticancer Research**, v. 33, n. 8, p. 3047–3052, 2013.

SHAFTI-KERAMAT, S. et al. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. **Journal of virology**, v. 77, n. 24, p. 13125–35, 2003.

SINGH, S.; KUMAR, P. U.; THAKUR, S. Expression / localization patterns of sirtuins (SIRT1 , SIRT2 , and SIRT7) during progression of cervical cancer and effects of sirtuin inhibitors on growth of cervical cancer cells. **Tumor Biology**, v. 36, n. 1, p. 6159–6171, 2015.

TERAMAE, M. et al. Sirtuin1 expression predicts the efficacy of neoadjuvant chemotherapy for locally advanced uterine cervical cancer. **Molecular and clinical oncology**, v. 3, n. 1, p. 73–78, 2015.

THE CANCER GENOMA ATLAS RESEARCH NETWORK. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. **Nature**, 2017.

TITOLO, S. et al. Role of the ATP-binding domain of the human papillomavirus type 11 E1 helicase in E2-dependent binding to the origin. **Journal of virology**, v. 73, n. 7, p. 5282–93, 1999.

TORRENS-MAS, M. et al. SIRT3 Silencing Sensitizes Breast Cancer Cells to Cytotoxic Treatments Through an Increment in ROS Production. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 406, n. July 2016, p. 397–406, 2016.

VASSILOPOULOS, A. et al. The human sirtuin family: evolutionary divergences and functions. **Human genomics**, v. 5, n. 5, p. 485–496, 2011.

VELEZ-PEREZ, A. et al. SIRT1 overexpression in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive squamous cell carcinoma. **Human pathology**, v. 59, p. 102–107, 2016.

VOELTER-MAHLKNECHT, S.; MAHLKNECHT, U. Cloning, chromosomal characterization and mapping of the NAD-dependent histone deacetylases gene sirtuin 1. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 17, n. 1, p. 59–67, 2006.

- WANG, J.-X. et al. Down-regulation of sirtuin 3 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma after resection. **BMC cancer**, v. 14, n. 1, p. 297, 2014.
- WANG, Q. et al. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1=E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. **Journal of virology**, v. 78, n. 2, p. 821–33, 2004.
- WEI, L. et al. Oroxylin A induces dissociation of hexokinase II from the mitochondria and inhibits glycolysis by SIRT3-mediated deacetylation of cyclophilin D in breast carcinoma. **Cell death & disease**, v. 4, n. 4, p. e601, 2013.
- WEN, B. et al. Inhibition of estrogen signaling activates the NRF2 pathway in breast cancer. **October**, v. 454, n. 1, p. 42–54, 2007.
- WEN, Y.-M.; WANG, Y.-X. Biological features of hepatitis B virus isolates from patients based on full-length genomic analysis. **Reviews in medical virology**, v. 19, n. 1, p. 57–64, 2009.
- WEYN, C. et al. Regulation of human papillomavirus type 16 early gene expression in trophoblastic and cervical cells. **Virology**, v. 412, n. 1, p. 146–155, 2011.
- XIONG, Y. et al. Sirtuin 3 : A Janus face in cancer (Review). **Internacional Journal of Oncology**, v. 49, p. 2227–2235, 2016.
- YANG, L. et al. Sirtuin 5: a review of structure, known inhibitors and clues for developing new inhibitors. **Science China Life Sciences**, p. 1–8, 2016.
- YOU, J. et al. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 349–360, 2004.
- YU, T. et al. The role of viral integration in the development of cervical cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 158, n. 1, p. 27–34, 2005.
- YU, W. et al. Loss of SIRT3 provides growth advantage for B cell malignancies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 7, p. 3268–3279, 2016.
- ZHANG, C. Z. et al. Low SIRT3 Expression Correlates with Poor Differentiation and Unfavorable Prognosis in Primary Hepatocellular Carcinoma. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.
- ZHAO, H. C. et al. Role of Sirt3 in mitochondrial biogenesis and developmental competence of human in vitro matured oocytes. **Human Reproduction**, v. 31, n. 3, p. 607–622, 2016.
- ZHAO, Y. et al. Sirtuin-3 (SIRT3) expression is associated with overall survival in

esophageal cancer. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 17, n. 6, p. 483–485, 2013.