

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LUANA QUADROS DE SOUZA LEÃO

**ANÁLISE DO PERFIL PROTEÔMICO E METABOLÔMICO DE
TECIDOS COM LESÕES PRECURSORAS DO CÂNCER DE COLO DE
ÚTERO EM MULHERES DO AMAZONAS**

MANAUS

2019

LUANA QUADROS DE SOUZA LEÃO

**ANÁLISE DO PERFIL PROTEÔMICO E METABOLÔMICO DE
TECIDOS COM LESÕES PRECURSORAS DO CÂNCER DE COLO DE
ÚTERO EM MULHERES DO AMAZONAS**

Dissertação de mestrado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em Química,
do Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal do Amazonas como
requisito para obtenção do título de Mestre
em Química na área de concentração
Produtos Naturais e Biomoléculas

Orientadora: Dr^a Priscila Ferreira de Aquino

MANAUS

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L687a Leão, Luana Quadros de Souza
Análise do perfil proteômico e metabolômico de tecidos com
lesões precursoras do câncer de colo de útero em mulheres do
Amazonas / Luana Quadros de Souza Leão . 2019
162 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Priscila Ferreira de Aquino
Dissertação (Mestrado em Química - Orgânica) - Universidade
Federal do Amazonas.

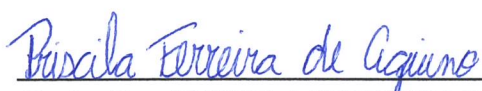
1. Neoplasias intraepiteliais cervicais. 2. Espectrometria de
massas. 3. Proteômica. 4. Metabolômica. I. Aquino, Priscila Ferreira
de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Análise do perfil proteômico e metabolômico de tecidos com
lesões precursoras do câncer de colo de útero em mulheres do
Amazonas

LUANA QUADROS DE SOUZA LEÃO

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química,
do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como
requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em 29 de novembro de 2019.



Profa. Dra. PRISCILA FERREIRA DE AQUINO
Presidente/Orientador - FioCruz/AM



Profa. Dra. CRISTINA MARIA BORBOREMA DOS SANTOS
Membro Externo - UFAM



Prof. Dr. RAFAEL GARRETT DA COSTA
Membro Externo - IQ/UFRJ

Dedico a todas as mulheres que lutam contra o câncer de colo
de útero e suas lesões precursoras.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, pela energia, coragem, saúde e garra para a realização dessa dissertação. Obrigada por ser meu controle, meu porto seguro e por me proporcionar momentos de grande aprendizagem tanto emocional quanto profissional durante essa etapa da minha vida. Obrigada por ter colocado pessoas maravilhosas em meu caminho, me dado forças para não desistir, oportunidades para errar, aprender e persistir para a realização desse sonho.

À minha família, especialmente às rainhas da minha vida, minha mãe Maria Alcilene Leonel Quadros e minha avó Josefa Leonel Quadros. Agradeço por terem me criado com tanto amor e carinho, por sempre me apoiarem nos momentos mais difíceis e decisivos da minha vida, eu amo vocês. Agradeço também ao meu pai, Ruy de S. Leão Filho por todo o apoio.

Ao meu avô Renato Oliveira Quadros (*in memoriam*) por ter sido o melhor avô do mundo, mesmo que infelizmente não tenhamos convivido por muito tempo. O senhor foi a minha motivação para a realização desse trabalho.

À minha orientadora Dra. Priscila Ferreira de Aquino por acreditar na minha capacidade para a execução desse estudo. Obrigada pela orientação, pelas noites sem dormir, pelo companheirismo, dedicação e por me proporcionar experiências enriquecedoras no âmbito científico. Obrigada por todas as palavras de incentivo, pelas críticas e pelos conselhos durante esse período. Sou grata por deixar essa singela frase marcada em minha vida: “Vai ser com emoção hein”. Literalmente, você estava certa.

Às pacientes da FCECON, que aceitaram participar voluntariamente desse estudo.

Aos médicos Jonas Balan de Padua, Zeliene Araújo de Souza, Gilson José Correa e Anderson Ferreira Gonçalves pela colaboração nas coletas das amostras, pelo cuidado, paciência e compreensão durante esse período. Agradeço pelos apelidos carinhosos: Pesquisadora mirim, Papa-cone e principalmente Caça-cone, no qual me tornou conhecida no centro cirúrgico; isso sem dúvidas ficará guardado em minhas lembranças. Agradeço também a todos os residentes e enfermeiros que contribuíram para a execução dessa etapa.

Ao meu grupo de pesquisa: Sofia Angiole, Juliana Leal, Kemily Nunes, Genésio

Pontes, Valderjane Aprígio, Jéssica Kelly Silva, Cláudia Araújo, Renato Hosanah e Marissa Anjos, por todo o auxílio, apoio, gargalhadas, reuniões, comilanças e principalmente por toda a contribuição durante o processo de desenvolvimento dessa dissertação. Sou muito grata por ser membro dessa equipe.

Ao Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza pela oportunidade e auxílio no início das análises de metabolômica. Agradeço em especial à Dra Elzalina Ribeiro pela motivação, ensinamentos, risadas, paciência e companheirismo durante essa etapa.

Ao Prof Dr. Rafael Garrett da Costa pelo apoio, contribuição, conhecimentos transmitidos e por me proporcionar uma grande experiência na área de metabolômica. Agradeço toda a sua equipe do Laboratório de Metabolômica (LABMETA): Evelyn Penaloza, Paula de Araújo, Ana Carolina Rosa, Carol Silva, Hygor de Souza, Vivian Noronha e Clarice Torres, pelo acolhimento, troca de conhecimentos, café, carinho e por toda a atenção e cuidado recebido. Sou grata especialmente à Dra. Marina Amaral por toda atenção, ensinamentos, ajuda, companheirismo e auxílio nas análises de metabolômica.

Ao doutorando Felipe Mansoldo e sua orientadora Prof^a Dra Alane Beatriz Vermelho, do Laboratório BIOINOVAR-UFRJ, pelo auxílio nas análises de metabolômica.

Ao Prof Dr. Fábio César Sousa Nogueira, pela contribuição, conhecimentos transmitidos e pela oportunidade de aprendizagem no ramo da abordagem proteômica. Agradeço toda a sua equipe do Laboratório de Proteômica (LABPROT), especialmente ao Joseph Evaristo, Gabriel Reis, Yasmin Araújo e Adrieli Alcaires, pelo apoio, parceria e auxílio durante as análises de proteômica.

Ao amigo MSc. Wagner Picanço Moreira pela paciência, ensinamentos, cuidado e apoio em todos os momentos durante o período desse estudo. Sem dúvidas, você foi essencial para essa conquista.

Aos amigos Josiana Moreira, Laiane Silva e Joed Augusto, por todo apoio e companheirismo adquiridos durante o período desse mestrado. Sou grata pela existência de cada um, pelas distrações, risadas e choros que fizeram parte desse momento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela bolsa de estudos concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao ILMD/FIOCRUZ-Amazonas, pela estrutura e participação

intensa nesse estudo.

Ao PPSUS, FAPEAM e o Governo do Estado do Amazonas, pelo financiamento do projeto.

À FCECON, pela estrutura e auxílio nas coletas de amostras.

Por fim, a todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a realização desse trabalho. Muito obrigada.

*“Não é necessário ver toda a estrada. Apenas dê
o primeiro passo”.*

Martin Luther King Jr.

RESUMO

O câncer é uma das doenças que causa mais mortes no mundo. Dentre os cânceres mais diagnosticados em mulheres no Brasil, especialmente no Amazonas, encontra-se o câncer de colo de útero. Esse geralmente é antecedido por lesões precursoras conhecidas como neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) de grau 1, 2 e 3, sendo os estágios 2 e 3 considerados de alto grau. A fim de prevenir a progressão dessas lesões precursoras a células cancerígenas, é necessário um melhor entendimento sobre o processo de evolução das NICs bem como buscar novos métodos capazes de identificá-las e diagnosticá-las previamente. Atualmente, a utilização das abordagens proteômica e metabolômica vem crescendo na área da pesquisa oncológica, permitindo a investigação de possíveis alterações e/ou interações de proteínas e metabólitos em decorrência de uma patologia. Nesse sentido, o presente estudo teve o objetivo de realizar análises do perfil proteico e metabólico em tecidos com NICs de alto grau, obtidos de mulheres voluntárias na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON). Para isso, amostras de tecidos com lesões de alto grau e suas respectivas margens adjacentes foram coletadas e submetidas a análise proteômica e metabolômica. Em proteômica, utilizou-se a abordagem proteômica *shotgun* para a inferência do perfil proteico, sendo a quantificação feita por *label-free* através dos cromatogramas de íons extraídos (XICs). Em metabolômica, foram empregadas análises estatísticas multivariadas como PCA e PLS-DA bem como a abordagem *Random Forest* a fim de verificar os metabólitos diferenciais presentes nessas amostras. Como resultado, verificou-se na análise proteômica que cada tipo de tecido possui diferenças entre si, apresentando proteínas unicamente expressas em cada condição e ainda proteínas superexpressas correlacionadas ao câncer cervical. Alguns exemplos foram: cortactina, mucina-5B, calnexina e cofilina-1, onde a maior abundância destas podem estar relacionadas à persistência ou progressão molecular dessas lesões precursoras. Já na análise metabolômica, verificou-se alterações nos perfis de metabólitos entre os tecidos de NIC 2 e NIC 3 e suas respectivas margens adjacentes, sendo condizente com os dados obtidos em proteômica. Além disso, foi possível observar a presença de alguns metabólitos que colaboram para a distinção desses tecidos como a histamina, presente principalmente nas margens adjacentes às lesões precursoras do câncer de colo de útero (CCU). Portanto, os dados encontrados nesse trabalho demonstram características interessantes, onde esperamos que possam contribuir para o entendimento mais abrangente em nível molecular sobre os possíveis mecanismos de progressão em tais células estudadas.

Palavras-chave: Neoplasias intraepiteliais cervicais, espectrometria de massas, proteômica, metabolômica.

ABSTRACT

Cancer is one of the diseases with high mortality in the world. Among the most diagnosed cancers in women in Brazil, especially in the Amazonas, cervical cancer stands out. This type of cancer is usually preceded by precursor lesions known as grade 1, 2 and 3 cervical intraepithelial neoplasia (CIN), where the stages 2 and 3 are considered high grade. In order to prevent the progression of these precursor lesions to cancer cells, a better understanding of the process of CIN evolution is needed, as well as search new methods capable of identifying and diagnosing them. Currently, the use of proteomic and metabolomic approaches has been growing in the area of cancer research, allowing the investigation of possible alterations or/and interactions of proteins and metabolites due to a pathology. In this sense, the present study aims to analyze the proteomic and metabolomic profile of tissues with high-grade CIN, obtained from volunteer women at the Oncology Control Foundation Center of the Amazonas state (FCECON). For this, samples of tissues with high-grade lesions and their respective adjacent margins were collected and submitted to proteomic and metabolomic analysis. In proteomics, the shotgun proteomic approach was used to infer the protein profile with label-free quantitation by extracted ion chromatograms (XICs). In metabolomics, multivariate statistical analyzes such as PCA and PLS-DA were employed as well as the Random Forest approach to verify the differential metabolites present in these samples. As a result, it was verified in the proteomic analysis that each type of tissue has differences, presenting proteins abundant in each condition and overexpressed proteins correlated to cervical cancer. Some examples were cortactin, mucin-5B, calnexin and cofilin-1, which may be related to the persistence or molecular progression of these precursor lesions. In the metabolomic analysis, it was observed changes in the metabolite profiles between the tissues of CIN 2 and CIN 3 and their respective adjacent margins, being consistent with the data obtained in proteomics. In addition, it was noted the presence of some metabolites that can contribute to the distinction of these tissues such as histamine, present mainly in the margins adjacent to the precursor lesions of the CCU. Therefore, the data found in this work demonstrate interesting features which we hope to contribute to a broader molecular understanding of the possible mechanisms of progression in such cells studied.

Keywords: Cervical intraepithelial neoplasms, mass spectrometry, proteomics, metabolomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da evolução das lesões precursoras até o câncer de colo de útero.	29
Figura 2 - Diferença entre a cérvix do colo uterino de mulheres com o colo uterino normal, com a NIC de baixo grau, com a NIC de alto grau e com câncer cervical.	30
Figura 3 – Fluxograma das ciências ômicas mais conhecidas e pesquisadas atualmente, sendo associadas ao grupo de biomoléculas específicas de cada abordagem.	32
Figura 4 – Representação de métodos de análise de dados utilizados na metabolômica: PCA e PLS-DA.	34
Figura 5 - Esquema dos principais componentes de um espectrômetro de massas.	35
Figura 6 - Representação esquemática do funcionamento da fonte de ionização por ESI.	36
Figura 7 - Representação esquemática do analisador quadrupolo.	37
Figura 8 – Representação do analisador <i>Orbitrap</i> , onde a detecção da corrente elétrica gerada pelo movimento dos íons é convertida em um espectro de massas através da transformada de Fourier.	38
Figura 9 – Representação geral das três principais abordagens proteômicas.	42
Figura 10 – Colo do útero de uma paciente definindo a área com a cerne da lesão e a margem de ressecção.	47
Figura 11 - Representação de um cromatograma de íons extraídos (XIC).	51
Figura 12 – Eletroforese unidimensional das amostras selecionadas para o estudo proteômico. Legenda: Amostras 7 e 19 – lesão NIC 3; Amostras 8 e 20 – margens NIC 3. Amostras 21 e 17 – lesão NIC 2; Amostras 22 e 18 – margens NIC 2.	58
Figura 13 – Eletroforese unidimensional das amostras selecionadas de NIC 2 para o estudo proteômico. Legenda: Amostras 3, 13 e 11 – lesão NIC 2; Amostras 4, 14 e 12 – margem NIC 2.	59
Figura 14 - Eletroforese unidimensional das amostras selecionadas de NIC 3 para o estudo proteômico. Legenda: Amostras 1, 9 e 5 – lesão de NIC 3; Amostras 2, 10 e 6 – margens de NIC 3.	60
Figura 15 – Rede de interações da proteína KRT17 através do programa STRING 11.0. As linhas na cor cinza mostram confiança de evidência na interação, sendo que quanto mais intenso é a cor e a linha, mais alta é a confiança (<i>score</i> > 0,9).	68
Figura 16 - Rede de interações da proteína RPLP1 através do programa STRING 11.0. As linhas na cor cinza mostram confiança de evidência na interação, sendo que quanto mais intenso é a cor e a linha, mais alta é a confiança (<i>score</i> > 0,9).	69
Figura 17 – Diagrama da distribuição diferencial de proteínas abundantes nas lesões de NIC 2 (lesão2) e NIC 3 (lesão3) associadas a proliferação celular.	70
Figura 18 – Rede de interações da proteína colágeno de cadeia alfa-1 (COL6A1) através do programa STRING 11.0. As linhas na cor cinza mostram confiança de evidência na interação, sendo que quanto mais intenso é a cor e a linha, mais alta é a confiança (<i>score</i> > 0,9).	74
Figura 19 – Rede de interações da proteína ribossômica 60S L3 (RPL3) e L31 (RPL31) através do programa STRING 11.0. As linhas na cor cinza mostram confiança de	

evidência na interação, sendo que quanto mais intenso é a cor e a linha, mais alta é a confiança (<i>score</i> > 0,9).....	76
Figura 20 – Diagrama de distribuição diferencial de proteínas abundantes nas margens adjacentes de NIC 2 (margem2) e NIC 3 (margem3) associadas a processos de regulação biológica.	77
Figura 21 – Rede de interações da proteína TMPO através do programa STRING 11.0. As linhas na cor cinza mostram confiança de evidência na interação, sendo que quanto mais intenso é a cor e a linha, mais alta é a confiança (<i>score</i> > 0,9).	80
Figura 22 – Rede de interações da proteína HMGB1 através do programa STRING 11.0. As linhas na cor cinza mostram confiança de evidência na interação, sendo que quanto mais intenso é a cor e a linha, mais alta é a confiança (<i>score</i> > 0,9).	82
Figura 23 – Rede de interações da proteína CDC42 através do programa STRING 11.0. As linhas na cor cinza mostram confiança de evidência na interação, sendo que quanto mais intenso é a cor e a linha, mais alta é a confiança (<i>score</i> > 0,9).	84
Figura 24 – Rede de interações da proteína FTL através do programa STRING 11.0. As linhas na cor cinza mostram confiança de evidência na interação, sendo que quanto mais intenso é a cor e a linha, mais alta é a confiança (<i>score</i> > 0,9).	86
Figura 25 - Representação esquemática de duas abordagens empregadas em metabolômica, a <i>targeted</i> e a <i>untargeted</i>	92
Figura 26 – Metabólitos diferenciais encontrados ao comparar pacientes com câncer de colo de útero, neoplasias intraepiteliais cervicais e pacientes normais.	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o biênio 2018 – 2019, em mulheres na Região Norte, exceto os de pele não melanoma.	27
Tabela 2 – Perfil socioeconômico das mulheres envolvidas no estudo proteômico. ..	53
Tabela 3 – Perfil clínico das mulheres envolvidas no estudo proteômico (Parte 1). ...	54
Tabela 4 – Perfil clínico das mulheres envolvidas no estudo proteômico (Parte 2). ...	54
Tabela 5 - Lista de algumas das proteínas diferencialmente abundantes quando comparados lesões de NIC 2 e lesões de NIC 3*.	71
Tabela 6 - Lista de algumas das proteínas diferencialmente abundantes quando comparados margem adjacente de NIC 2 com de NIC 3*.	77
Tabela 7 – Lista de algumas proteínas diferencialmente abundantes quando comparados cerne da lesão de NIC 2 e margem adjacente de NIC 2*.	87
Tabela 8 – Lista de algumas proteínas diferencialmente abundantes quando comparados cerne da lesão de NIC 3 e margem adjacente de NIC 3*.	88
Tabela 9 – Ressuspensão das amostras da otimização para o estudo metabolômico.	97
Tabela 10 – Ressuspensão e volume de injeção das amostras para o estudo metabolômico.	98
Tabela 11 – Perfil socioeconômico das mulheres envolvidas no estudo metabolômico.	102
Tabela 12 – Perfil clínico das mulheres envolvidas no estudo metabolômico (Parte 1).	102
Tabela 13 – Perfil clínico das mulheres envolvidas no estudo metabolômico (Parte 2).	103

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Características gerais das mulheres envolvidas no estudo proteômico. .	52
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Cromatogramas de uma réplica técnica de amostras do cerne da lesão de NIC 2 (preto) e NIC 3 (vermelho) durante uma análise de 180 minutos.....	56
Gráfico 2 - Cromatogramas de uma réplica técnica de amostras da margem adjacente de NIC 2 (preto) e NIC 3 (vermelho) durante uma análise de 180 minutos.....	56
Gráfico 3 - Resultado da análise no <i>Gene Ontology</i> referente ao cerne das lesões de NIC 2 e NIC 3, mostrando as funções das proteínas identificadas em porcentagem nos tecidos analisados.	62
Gráfico 4 - Gráfico do resultado da análise no <i>Gene Ontology</i> referente as margens adjacentes de NIC 2 e NIC 3, mostrando as funções das proteínas identificadas em porcentagem nos tecidos analisados.	63
Gráfico 5 - Diagrama de Venn referente às proteínas expressas nas lesões de NIC 2 e NIC 3. Legenda: Proteínas expressas unicamente nas lesões de NIC 2 (roxo), proteínas expressas unicamente em NIC 3 (vermelho) e proteínas compartilhadas em ambas (rosa).	66
Gráfico 6 - Diagrama de Venn referente às proteínas expressas nas margens adjacentes de NIC 2 e NIC 3. Legenda: Proteínas exclusivamente abundantes nas margens de NIC 2 (azul), exclusivas em margens de NIC 3 (amarelo) e compartilhadas em ambas as condições (azul-amarelo).....	73
Gráfico 7 - Diagrama de Venn referente às proteínas expressas nas lesões de NIC 2 e suas margens adjacentes. Legenda: Proteínas expressas exclusivamente nas lesões de NIC 2 (rosa), proteínas expressas apenas na margem (lilás) e proteínas compartilhadas em ambas (roxo).	79
Gráfico 8 - Diagrama de Venn referente às proteínas expressas nas lesões de NIC 3 e suas margens adjacentes. Legenda: Proteínas expressas exclusivamente nas lesões de NIC 3 (rosa), proteínas expressas apenas na margem (azul turquesa) e proteínas compartilhadas em ambas (azul).	83
Gráfico 9 - Distribuição das mulheres selecionadas para o estudo metabolômico de acordo com o tipo de lesão.	101
Gráfico 10 - Cromatogramas das amostras relacionados a metodologia 1 (M1), 2 (M2) e 3 (M3) – teste 1.	104
Gráfico 11 - Cromatogramas das amostras relacionados a metodologia 1 (M1), 2 (M2) e 3 (M3) – teste 2.	105
Gráfico 12 – Cromatogramas das amostras do estudo metabolômico.....	106
Gráfico 13 - PCA das amostras NIC 2 – margem (verde) e lesão (vermelho), e NIC 3 – margem (marrom) e lesão (laranja).....	107
Gráfico 14 - PLS-DA das amostras NIC 2 - margem (azul), NIC 3 - lesão (cinza), NIC 2 – lesão (laranja) e NIC 3 – margem (laranja), apresentando semelhanças entre as amostras de lesão de NIC 2 e a margem adjacente de NIC 3..	108
Gráfico 15 - PLS-DA em 3D das amostras NIC 2 - margem (azul), NIC 3 - lesão (verde), NIC 3 – margem (laranja) e NIC 2 – lesão (laranja), apresentando semelhanças entre as amostras de lesão de NIC 2 e a margem adjacente de NIC 3.	108
Gráfico 16 - PLS-DA referente as variáveis de impacto presentes nas amostras de T e M.	109

Gráfico 17 - PCA das amostras de lesões NIC 2 e NIC 3 (representados por T) e margens adjacentes à lesão NIC 2 e NIC 3 (representados por M).....	110
Gráfico 18 - Possíveis outliers baseados na distância ortogonal referentes as amostras de T e M.	110
Gráfico 19 - PLS-DA das amostras das lesões NIC 2 e NIC 3 (T – em laranja) e margens adjacente NIC 2 e NIC 3 (M – em azul), após remoção dos outliers.....	111
Gráfico 20 - PLS-DA em 3D das amostras de lesões NIC2/NIC3 (T – em laranja) e margens adjacentes de NIC 2/NIC 3 (M – em azul).	112
Gráfico 21 - <i>Loadings</i> referentes as variáveis de maior relação com a componente 1 (em A) e a componente 2 (em B).	112
Gráfico 22 - Classificação das amostras por <i>Random Forest</i> através das variáveis mais importantes para o modelo.....	113
Gráfico 23 - Diferença significativa das variáveis do modelo <i>Random Forest</i> com o grupo T (lesões NIC 2 e NIC 3) sendo superior ao grupo M (margens NIC 2 e NIC 3) ($p < 0,05$) (Parte 1).....	114
Gráfico 24 - Diferença significativa das variáveis do modelo <i>Random Forest</i> com o grupo T (lesões NIC 2 e NIC 3) sendo superior ao grupo M (margens NIC 2 e NIC 3) ($p < 0,05$) (Parte 2).....	115
Gráfico 25 - Diferença significativa da variável do modelo <i>Random Forest</i> com o grupo M (margens NIC 2 e NIC 3) sendo superior ao grupo T (lesões NIC 2 e NIC 3) ($p < 0,05$).	115
Gráfico 26 - Espectros de MS2 da histamina. Em preto, o espectro MS2 experimental com m/z de 112.08694. Em vermelho, o espectro de MS2 do banco de dados MONA utilizando o <i>software</i> livre MS-DIAL.....	116
Gráfico 27 - Espectro de massas em MS2 do íon de 112,05 m/z ($[M+H]^+$).	117
Gráfico 28 - Diferença significativa da variável X11.869x112.08693 no modelo <i>Random Forest</i> com o grupo M (margens NIC 2 e NIC 3) sendo superior ao grupo T (lesões NIC 2 e NIC 3) ($p < 0,05$).	117

LISTA DE SÍMBOLOS E ACRÔNIMOS

1-DE	-	Eletroforese unidimensional
2D-DIGE	-	Eletroforese em gel de diferença bidimensional (do inglês <i>two-dimensional Difference Gel Electrophoresis</i>)
2-DE	-	Eletroforese bidimensional
Aa	-	Aminoácido
ACN	-	Acetonitrila
ACTR2	-	Proteína 2 relacionada à actina
ACTR3	-	Proteína 3 relacionada à actina
AGC	-	Controle de ganho automático (do inglês <i>Automatic Gain Control</i>)
ATP	-	Adenosina trifosfato
BSA	-	Albumina sérica bovina
CAF	-	Cirurgia de alta frequência
CAPG	-	Proteína de captação de macrófagos
CCU	-	Câncer de colo de útero
CDC42	-	Homólogo da proteína 42 de controle da divisão celular
CEC	-	Carcinoma espinocelular cervical
CECS	-	Carcinoma de células escamosas cervicais
CE-MS	-	Eletroforese Capilar acoplada a Espectrometria de Massas (do inglês <i>Capillary electrophoresis–mass spectrometry</i>)
CEP	-	Comitê de Ética em Pesquisa
CL-EMAR	-	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução
CML	-	Citologia em meio líquido
COL6A1	-	Colágeno de cadeia alfa-1
COL6A3	-	Colágeno de cadeia alfa-3
DC	-	Voltagem de corrente direta (do inglês <i>direct-current</i>)
DDA	-	Aquisição dependente de dados (do inglês <i>Data Dependent Acquisition</i>)
DMBT1	-	Excluído no tumor cerebral maligno 1 (do inglês <i>Deleted in malignant brain tumors 1 protein</i>)
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico
DP	-	Desvio padrão
DST	-	Doenças sexualmente transmissíveis
DTT	-	Ditiotreitol
ESI	-	Ionização por Electrospray (do inglês <i>Electrospray ionization</i>)
FCECON	-	Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas
FCGBP	-	Proteína de ligação a IgGFc (do inglês <i>IgGFc-binding protein</i>)
FDR	-	Taxa de Falsos Positivos (do inglês <i>False Discovery Rate</i>)
FIGO	-	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (do inglês <i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i>)
FTH1	-	Cadeia pesada da ferritina
FT-ICR	-	Ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier-transform ion cyclotron resonance</i>)
FTL	-	Cadeia leve da ferritina (do inglês <i>Ferritin light chain</i>)
GC-MS	-	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
HCD	-	Dissociação por colisão de alta energia (do inglês <i>High Energy Collision Dissociation</i>)

HIV	-	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMGB1	-	Proteína B1 do grupo de alta mobilidade
HPV	-	Papilomavírus Humano (do inglês <i>Human Papiloma Virus</i>)
HSA	-	Albumina sérica humana
HSIL	-	Lesões intraepiteliais escamosas de alto grau
IAA	-	Iodoacetamida
INCA	-	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IUCC	-	União internacional para controle do câncer (do inglês <i>International Union Cancer</i>)
KDa	-	Quilodalton
KRT1	-	Queratina 1 do citoesqueleto, tipo II
KRT17	-	Queratina 17 do citoesqueleto, tipo I
Kv	-	Quilovolt
LC	-	Cromatografia líquida
LC-MS	-	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LCN2	-	Lipocalina associada a gelatinase neutrófila
LMNB1	-	Lâmina B1
LSIL	-	Lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau
m/z	-	Razão massa/carga
MALDI	-	Ionização/dessorção a laser auxiliada por matriz (do inglês <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>)
MARCKS	-	Substrato c-cinase rico em alanina miristoilada (do inglês <i>Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate</i>)
MIC	-	Carcinoma microinvasivo
mM	-	Milimolar
MS	-	Espectrometria de massas (do inglês <i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	-	Espectrometria de massas sequencial (do inglês <i>Tandem Mass Spectrometry</i>)
MS1	-	Perfil do espectro de massas
MS2	-	Varredura de íons produtos
MTBE	-	Éter metil-terc-butílico
NCE	-	Energia de colisão normalizada
NH₄HCO₃	-	Bicarbonato de amônio
NIC 1	-	Neoplasia intraepitelial cervical de grau I
NIC 2	-	Neoplasia intraepitelial cervical de grau II
NIC 3	-	Neoplasia intraepitelial cervical de grau III
NICs	-	Neoplasias intraepiteliais cervicais
nLC-MS/MS	-	Nanocromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas sequencial
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
OT	-	<i>Orbitrap</i>
p/v	-	razão peso/volume
p53	-	Proteína supressora tumoral
PC	-	Componente Principal
PCA	-	Análise de Componentes Principais (do inglês <i>Principal Component Analysis</i>)
PCOLCE	-	Proteína potenciadora de procolágeno C-endopeptidase 1 (do inglês <i>Procollagen C-endopeptidase enhancer 1</i>)
PLS-DA	-	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (do inglês <i>Partial Least Squared Discriminant Analysis</i>)

Q	-	Quadrupolo
QC	-	Controle de Qualidade (do inglês <i>Quality Control</i>)
RF	-	Fase reversa (do inglês <i>Reverse Phase</i>)
RF*	-	<i>Random Forest</i>
RMN ¹H	-	Ressonância magnética nuclear de Hidrogênio
RNA	-	Ácido ribonucleico
RPL10	-	Proteína ribossômica 60S L10
RPL3	-	Proteína ribossômica 60 S L3
RPL31	-	Proteína ribossômica 60 S L31
RPL9	-	Proteína ribossômica 60S L9
RPLP1	-	Proteína ribossômica ácida 60S P1 (do inglês <i>60S acidic ribosomal protein P1</i>)
SDS	-	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	-	Eletroforese em gel de poliacrilamida (do inglês <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SELDI	-	Ionização/dessorção por laser em superfície melhorada (do inglês <i>Surface-enhanced laser desorption/ionization</i>)
SERPINA7	-	Globulina de ligação à tiroxina (do inglês <i>Thyroxine-binding globulin</i>)
Sisgen	-	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
STRING	-	Ferramenta de pesquisa para a recuperação de genes/proteínas em interação (do inglês <i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins</i>)
TBS	-	Sistema Bethesda (do inglês <i>The Bethesda System</i>)
TCLE	-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEMED	-	Tetrametiletilenodiamina
TFA	-	Ácido trifluoroacético
TMPO	-	Polipeptídeo 2 associado à lâmina
TNM	-	Sistema de Classificação dos Tumores Malignos
TOF	-	Tempo de voo (do inglês <i>Time of flight</i>)
TPD52	-	Proteína tumoral D52
Tris-HCl	-	Tris (hidroximetil) aminometano - Ácido Clorídrico (do inglês <i>Tris (hydroxymethyl) aminomethane - Hydrochloric acid</i>)
UPLC-QTOF-MS	-	<i>Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry</i>
v/v	-	razão volume/volume
XIC	-	Cromatograma de íon extraído (do inglês <i>Extracted-Ion Chromatogram</i>)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
OBJETIVOS	25
Geral	25
Específicos	25
Capítulo I	26
Câncer de colo de útero, NICs e Ciências 'Ômicas'	26
1.1 Câncer de colo de útero	27
1.2 Neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs)	29
1.3 Ciências 'Ômicas'	31
1.4 Quimiometria aplicada a Ciências 'Ômicas'	33
1.5 Espectrometria de massas	35
Capítulo II	40
Análise Proteômica	40
2.1 Proteômica	41
2.2 Proteômica aplicada ao câncer	43
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
2.3.1 Seleção de pacientes	45
2.3.2 Coleta de dados	46
2.3.3 Coleta e preservação das amostras	46
2.3.4 Estudo proteômico das NICs de alto grau	47
2.3.4.1 Pulverização e extração proteica	47
2.3.4.2 Eletroforese unidimensional	47
2.3.4.3 Coloração com Coomassie R-250	48
2.3.4.4 Digestão proteica em solução	48
2.3.4.5 Preparação das amostras para análise nLC – MS/MS	49
2.3.4.6 Aquisição de dados por nanocromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas sequencial (nLC – MS/MS)	49
2.3.4.7 Análise dos dados	50
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
2.4.1 Características gerais dos indivíduos para o estudo proteômico	52
2.4.2 Estudo proteômico	55
2.4.3 Análise do gel unidimensional (1D)	57
2.4.4 Identificação proteica	60

2.4.5 Análise diferencial das NICs e suas respectivas margens adjacentes	66
Capítulo III	90
Análise Metabolômica	90
3.1 Metabolômica	91
3.2 Metabolômica aplicada ao câncer	93
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	96
3.3.1 Seleção de pacientes	96
3.3.2 Estudo metabolômico das NICs de alto grau	96
3.3.2.1 Preparo das amostras	96
3.3.2.2 Método tipo <i>Matyash</i> (Adaptação)	98
3.3.2.3 Aquisição de dados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CL – EMAR)	98
3.3.2.4 Análise de dados	99
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
3.4.1 Características gerais dos indivíduos para o estudo metabolômico	101
3.4.2 Otimização do preparo de amostras para análise metabolômica	104
3.4.3 Estudo metabolômico	106
Capítulo IV	119
Considerações Finais	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
ANEXOS	148
ANEXO A: Parecer do Comitê de ética em pesquisa – UFAM	149
ANEXO B: Parecer do Comitê de ética em Pesquisa – FCECON	151
ANEXO C: Cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (Sisgen)	153
APÊNDICES	154
APÊNDICE A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	155
APÊNDICE B: Questionário	157
APÊNDICE C: Características gerais das mulheres envolvidas no estudo metabolômico	160

PREFÁCIO

Esta dissertação foi dividida em quatro capítulos. O Capítulo 1 aborda uma revisão sobre o câncer de colo de útero, as neoplasias intraepiteliais cervicais e as ciências 'ômicas'. O Capítulo 2 e o Capítulo 3 apresentam as abordagens 'ômicas' utilizadas no decorrer desta dissertação; especificamente, no Capítulo 2 aborda a parte da análise proteômica e o Capítulo 3 apresenta a parte metabolômica. Por fim, o Capítulo 4 demonstra as considerações finais do trabalho perante todas as análises realizadas.

INTRODUÇÃO

O número de casos de câncer em todo o mundo tem crescido notavelmente a partir do século passado, sendo um dos problemas de saúde pública mais importantes da atualidade. No Brasil, o câncer é a segunda causa de mortalidade da população, superado apenas pelas doenças cardiovasculares (OMS, 2017)

Dentre os tipos de cânceres, o quarto mais comum entre as mulheres, não somente no Brasil, mas em todo o mundo é o câncer de colo de útero (CCU). Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), é estimado um risco de 15,43 novos casos a cada 100 mil mulheres no Brasil durante o biênio 2018-2019, sendo o primeiro em incidência na Região Norte (INCA, 2017).

O câncer de colo de útero evolui através de lesões precursoras conhecidas como lesões intraepiteliais escamosas de alto grau. Estas quando são diagnosticadas de forma precoce e tratadas adequadamente, podem impedir a progressão para o câncer (SPECK et al., 2015).

Neste contexto, uma variedade de técnicas está sendo utilizada para compreender os diversos mecanismos biológicos relacionados ao processo tumoral que são responsáveis por alterações desenvolvidas no decorrer da doença. Dentre elas, pode-se citar as chamadas ciências ômicas. Essas compreendem abordagens voltadas ao entendimento dos sistemas biológicos através da caracterização e identificação de biomoléculas de um determinado grupo, como as proteínas (proteômica) e metabólitos (metabolômica); bem como analisar as interações envolvidas entre eles a partir do auxílio de técnicas experimentais, *softwares* e bancos de dados que proporcionam estudos cada vez mais abrangentes (CANUTO et al., 2018; ESPINDOLA et al., 2010).

A análise proteômica e metabolômica tem dado novas oportunidades para descobertas significativas a respeito dos processos normais e anormais que acontecem no organismo humano, inclusive com relação a doenças como o câncer e suas lesões precursoras. Uma das ferramentas mais utilizadas para a análise dessas alterações é a espectrometria de massas (MS), a qual possibilita identificar e quantificar uma multiplicidade de moléculas simultaneamente através da relação massa/carga (m/z) (BANACH et al., 2017).

De maneira geral, análises em nível molecular são bastante interessantes para o combate ao câncer e suas lesões, visto que podem demonstrar características ou

biomoléculas específicas de uma dada condição biológica. Tal fato é especialmente atraente para a área clínica e/ou oncológica, e pode resultar em uma futura aplicabilidade para o paciente quanto ao rastreamento, diagnóstico diferencial, monitoramento da doença, entre outros. Logo, o presente trabalho utilizou a espectrometria de massas nas análises proteômicas e metabolômicas de tecidos das lesões precursoras do câncer de colo de útero, com o propósito de auxiliar na compreensão do processo proteico e metabólico presente nesses tecidos, que possam estar associados à uma possível evolução dessa doença.

Assim, este projeto se justificou pelos seguintes fatores:

- Na Região Norte existe uma grande incidência de casos de mulheres com câncer de colo de útero. Especialmente no Amazonas, a taxa bruta é de 40,97 a cada 100 mil mulheres de acordo com a última estimativa, sendo o estado com maior incidência. Para a cidade de Manaus, o panorama é ainda mais preocupante, com uma taxa bruta de 58,37 a cada 100 mil mulheres;
- Este é o primeiro estudo com enfoque em análises das lesões precursoras do câncer cervical utilizando a abordagem proteômica e metabolômica no Amazonas;
- Em Manaus, o índice de casos de lesões precursoras de alto grau vem aumentando no decorrer dos anos, segundo dados da Fundação Centro de Controle de Oncologia (FCECON);
- Estudos voltados a identificar biomoléculas diferenciais que auxiliem no diagnóstico precoce e na compreensão sobre a evolução das neoplasias intraepiteliais cervicais ao câncer de colo de útero são importantes, visto que podem contribuir para a sobrevida do paciente;
- Resultados presentes na literatura relatam o uso da espectrometria de massas juntamente com as ciências ômicas, em especial a proteômica e metabolômica, como um instrumento promissor para diagnósticos clínicos de diferentes doenças, incluindo o câncer;
- Adicionalmente, a utilização de ferramentas analíticas e a bioinformática aplicada a área médica possui carência na região norte, necessitando ser impulsionada a formação de recursos humanos e novos projetos de pesquisa nessa temática.

OBJETIVOS

Geral

- Analisar o perfil proteico e metabólico do tecido de pacientes com lesões precursoras do câncer de colo de útero.

Específicos

- Caracterizar o perfil proteico e metabólico das lesões precursoras bem como das regiões adjacentes à lesão por espectrometria de massas;
- Investigar por técnicas estatísticas as possíveis diferenças de metabólitos entre as amostras;
- Buscar proteínas e metabólitos diferenciais que sejam específicos das lesões precursoras de alto grau e/ou associados ao processo de malignização.

Capítulo I

Câncer de colo de útero, NICs
e Ciências ‘Ômicas’

1.1 Câncer de colo de útero

O câncer de colo de útero (CCU), conhecido também como câncer cervical, é uma doença que se desenvolve lentamente, tendo fases pré-malignas. Esse tipo de câncer possui caráter invasivo e é antecedido por diversas modificações no epitélio cervical original, envolvendo desde as lesões contidas no epitélio do colo uterino até a sua evolução a um carcinoma invasivo. Assim, as células pré-cancerígenas se transformam em tumores malignos acometendo a cérvix (subdividida em endocérvix e ectocérvix), dando origem ao câncer cervical (KOSS; GOMPEL, 2006).

Esse, por sua vez, é o quarto tipo de câncer mais frequente mundialmente na população feminina, sendo responsável por 7,5% de todas as mortes por câncer entre as mulheres (BRAY et al., 2018; DE MARTEL et al., 2017). Para 2018, foi estimado cerca 570.000 casos e 311.000 mortes em todo o mundo (BRAY et al., 2018). Adicionalmente, é a principal causa de morte entre mulheres que vivem em países em desenvolvimento (MENDONÇA et al., 2008; THULER, 2008), sendo o décimo lugar no *ranking* de mortalidade mundial (BRAY et al., 2018).

No Brasil, estima-se cerca de 16.370 novos casos de CCU para cada ano durante o biênio 2018-2019, sendo o risco estimado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres, ocupando a terceira posição. Na Região Norte, especialmente, o câncer de colo de útero é o primeiro mais incidente (25,62/100 mil), com exceção dos tumores de pele não melanoma (Tabela 1). No Amazonas, o panorama ainda é mais preocupante na qual estima-se 840 novos casos, uma taxa bruta de 40,97 a cada 100 mil mulheres. Desses, 640 novos casos apenas para a capital de Manaus, com uma taxa bruta de 58,37 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2017).

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o biênio 2018 – 2019, em mulheres na Região Norte, exceto os de pele não melanoma.

	Localização Primária	Casos	%
Mulheres	Colo do Útero	2.300	24,8%
	Mama Feminina	1.730	18,6%
	Cólon e Reto	660	7,1%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	520	5,6%
	Estômago	480	5,2%
	Leucemias	310	3,3%
	Ovário	270	2,9%
	Glândula Tireoide	270	2,9%
	Sistema Nervoso Central	270	2,9%
	Corpo do Útero	200	2,2%

Fonte: Adaptado de (INCA, 2017).

Esta alta incidência do câncer cervical está associada ao principal fator etiológico dessa doença, a infecção persistente do papilomavírus humano (HPV). Essa infecção pode possibilitar o surgimento das lesões precursoras do câncer cervical ou até mesmo o câncer, de forma incomum (SANCHES et al., 2017). Existem vários subtipos oncológicos do vírus HPV, dentre eles o 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, 68 e 82 são considerados de alto risco ao desenvolvimento oncogênico, sendo o HPV-16 e o HPV-18 os mais prevalentes (CHELIMO et al., 2013).

Além dos fatores associados à infecção pelo HPV, outros aspectos relacionados à genética, imunidade e ao comportamento sexual podem corroborar para a persistência dessa infecção e assim surgir as lesões precursoras (neoplasias intraepiteliais cervicais – NICs) ou o câncer. Sendo assim, o histórico familiar, a iniciação sexual precoce, tabagismo, a multiplicidade de parceiros sexuais, comprometimento da imunidade, paridade, utilização de métodos contraceptivos hormonais, nível socioeconômico, além de coinfeções por *Chlamydia trachomatis* e HIV são citados também na literatura como fatores de risco desse tipo de câncer (ZARDO et al., 2014).

A progressão do estadiamento da doença depende especificamente da fase em que é detectado o câncer de colo de útero, o que influencia na sobrevida das pacientes. Quanto ao grau da doença, Nakagawa e colaboradores (2011) relata que a sobrevida das mulheres que apresentam casos da doença em metástase é desfavorável, com uma taxa de sobrevida de 28,9%. Já na ausência de metástase, a taxa de sobrevida se eleva, sendo 80%. Em adição, essa taxa aumenta significativamente quando a doença é detectada nos estágios I e II (93,5% e 100%, respectivamente), mostrando que se o câncer for detectado e tratado em sua fase inicial, há mais chances de sobrevivência e cura das paciente (NAKAGAWA et al., 2011).

Atualmente, como forma de prevenção à doença, existe a vacina quadrivalente contra o HPV que o Ministério da Saúde adotou e que confere proteção contra os genótipos de baixo risco (HPV 6 e 11) e de alto risco (HPV 16 e 18) (BRASIL, 2014). Já a triagem para o diagnóstico do câncer de colo de útero pode ser realizada por diversos métodos, dentre eles: citologia convencional, conhecido como teste de Papanicolaou (RIBEIRO; ANDRADE, 2016), citologia em meio líquido (CML) (SILVA et al., 2018) e detecção do DNA do HPV (MITTELDORF, 2016). Contudo, a forma de rastreamento mais utilizada no setor público é o exame de citologia convencional (Papanicolaou), que possui baixa sensibilidade (50%), com números de falso-negativos que varia de 20 a 40% (STABILE et al., 2012). De acordo com a Política Nacional de Atenção Integral à

Saúde da Mulher (2004), a prevenção do câncer cervical bem como o diagnóstico precoce e seu tratamento ainda necessita da implantação de medidas que envolvam a mobilização das mulheres, melhoramento nos sistemas de informação e investimento tecnológico. Assim, ainda é preciso buscar por novas estratégias que possam contribuir para a detecção desse tipo de câncer e principalmente das lesões precursoras.

1.2 Neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs)

O câncer de colo uterino é precedido por lesões precursoras, conhecidas como Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NICs). Estas se desenvolvem na região do trato genital inferior e possui como característica a perda da arquitetura do epitélio cervical (CAIXETA, 2014). Estas neoplasias começam pela ação da infecção pelo HPV na cérvix normal. Sua persistência pode iniciar alterações morfológicas celulares que caracterizam as lesões precursoras da carcinogênese cervical, que se não forem diagnosticadas e tratadas precocemente podem evoluir ao câncer de colo de útero (Figura 1) (CAIXETA, 2014; SOCIETY, 2018). Este processo, da infecção às lesões precursoras e posteriormente à doença invasiva, leva em média de 10 – 15 anos, porém há relatos do desenvolvimento do câncer cervical em períodos mais curtos (HILDESHEIM et al., 1999; SOCIETY, 2018).

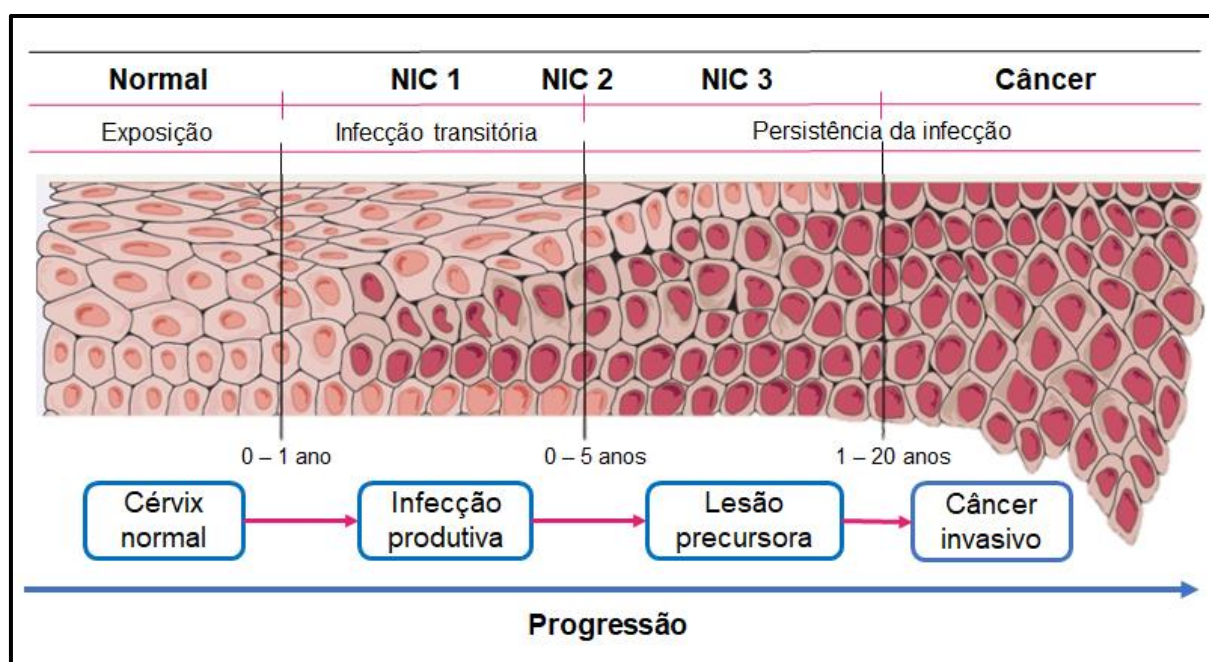


Figura 1 - Representação da evolução das lesões precursoras até o câncer de colo de útero.

Fonte: Adaptado de (CROW, 2012).

Essas lesões podem ser classificadas em graus histopatológicos através da espessura do epitélio que está sendo agredido pelas alterações. De acordo com Richart (1973), as NICs são graduadas tendo em vista a intensidade das anormalidades analisadas histologicamente. Assim, a neoplasia intraepitelial de baixo grau (NIC 1) ocorre quando acomete um terço do epitélio, no qual há perda de diferenciação e alterações celulares nas células imaturas, sendo considerada displasia leve. Já em NIC 2 é comprometido dois terços do epitélio, incluindo as camadas basal e suprabasal e NIC 3 ocupa todo o epitélio (CAIXETA, 2014; CARVALHO; QUEIROZ, 2010).

Com relação a classificação pela nomenclatura do Sistema de Bethesda (TBS – *The Bethesda System*), essas neoplasias são divididas em dois termos: lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) e lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL). As LSIL correspondem as neoplasias intraepiteliais de grau leve (NIC 1). Já as HSIL correspondem as neoplasias intraepiteliais de grau moderado (NIC 2) e de alto grau (NIC 3) (Figura 2) (JÚNIOR; LIMA; SILVA, 2018; SOUZA et al., 2004).

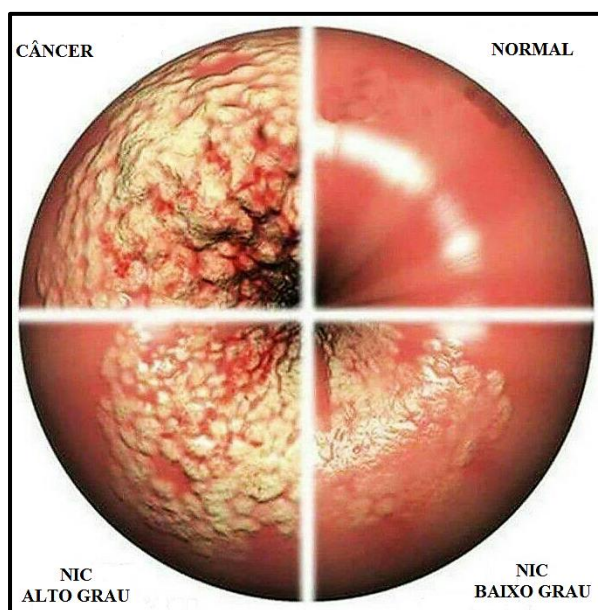


Figura 2 - Diferença entre a cérvix do colo uterino de mulheres com o colo uterino normal, com a NIC de baixo grau, com a NIC de alto grau e com câncer cervical. **Fonte:** *falasil.com*

A triagem para o diagnóstico precoce dessas lesões é realizada através de exames ginecológicos, citopatológicos e colposcópicos. Já o tratamento é feito de acordo com o tipo de lesão (INCA, 2011). No caso das NICs 2 e 3, são realizadas cirurgias sob anestesia através de um procedimento denominado de conização ou

exérese da zona de transformação. Este consiste na remoção da lesão intraepitelial cervical do colo do útero no formato de cone (KIGURE et al., 2018). Dentre os principais meios de excisão, tem-se a conização com bisturi a frio e a cirurgia de alta frequência (CAF) (LIMA et al., 2011).

A infecção persistente do papilomavírus humano (HPV) é indicado como um dos fatores responsáveis dessas neoplasias, onde aproximadamente 90% dos casos de NIC 2 e NIC 3 e dos carcinomas invasivos do colo estão envolvidos pela infecção do HPV de alto risco (BRUNI et al., 2010; MURILLO et al., 2009; ROSA et al., 2009a).

O HPV subtipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 são significativamente associados com NIC e a neoplasia invasiva (OLIVEIRA, 2011). A causa dessas transformações está ligada ao mecanismo de ação do vírus HPV em dois genes, o E6 e E7. O gene E6 é capaz de conectar-se à proteína p53, estimulando a degradação proteolítica de forma rápida. Já o gene E7 possui a capacidade de se unir com a proteína supressora de tumor denominada proteína retinoblastoma (pRb), tornando-a inativa. Adicionalmente, quando ocorrem alterações nas células provenientes do vírus HPV no gene E7, a proteína p16^{INK4a} é expressa e pode ser detectada através da imuno-histoquímica, sendo considerada como marcador para diagnóstico das lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (DOORBAR et al., 2015; JUNIOR; GIRALDO; GONÇALVES, 2006; OLIVEIRA, 2011).

Um estudo interessante com relação a regressão e progressão das neoplasias intraepiteliais cervicais foi realizado por Giaccio e colaboradores (2010), que acompanhou 63 pacientes com idade média de 28,8 anos contendo a presença de LSIL pela histologia durante 18 meses. Em resumo, das 63 pacientes estudadas com LSIL na primeira consulta, 9 (14,28%) pacientes evoluíram em algum momento do acompanhamento por 18 meses para HSIL, enquanto a lesão regrediu nas demais (85,72%) (GIACCIO et al., 2010).

1.3 Ciências 'Ômicas'

Nas últimas décadas, avanços significativos na área da pesquisa biomédica têm sido estimulados através de diversas abordagens, entre elas têm-se as ciências 'ômicas'. Estas referem-se a técnicas que possuem como objetivo caracterizar e quantificar em grande escala biomoléculas de um determinado grupo, bem como suas interações através de técnicas experimentais, auxílio de bancos de dados e softwares que permitem

o fornecimento de grandes conjuntos de dados relacionados aos diversos níveis de organização biológica (BARH; BLUM; MADIGAN, 2016; STAGLJAR, 2016).

Essas tecnologias englobam quatro grupos principais de campos de estudo: a genômica, a transcriptômica, a proteômica e a metabolômica (Figura 3). A genômica é a abordagem utilizada para o estudo do genoma, onde obtêm-se dados referentes à sequência completa do material genético, ou seja, o DNA (ácido desoxirribonucleico) do indivíduo a ser estudado. A transcriptômica corresponde ao estudo do transcriptoma (RNAs) das células, na qual os RNAs possuem a capacidade de determinar quais genes são expressos e como os níveis de expressão podem se alterar no decorrer da vida do organismo, sendo diferente do DNA pois esses se mantem estático. A proteômica é o estudo do conteúdo proteico, compreendendo as funções além de elucidar a identidade destas. Já a metabolômica envolve a análise de um conjunto de moléculas (metabólitos) contidas no metabolismo celular presente nas células, fluidos, tecidos corporais, entre outros (BARH; BLUM; MADIGAN, 2016; SOUZA; RHODEN; PAMPHILE, 2014).

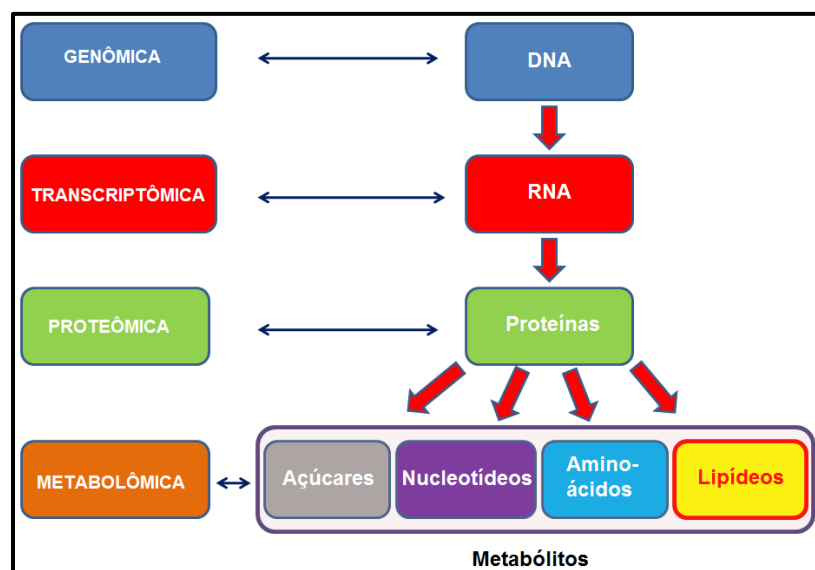


Figura 3 – Fluxograma das ciências ômicas mais conhecidas e pesquisadas atualmente, sendo associadas ao grupo de biomoléculas específicas de cada abordagem.

Fonte: Adaptado de temasbio.ufscar.br

O interesse pelas ciências ômicas vem aumentando entre a comunidade científica. Estas têm sido empregadas no estudo de microrganismos (SÁNCHEZ et al., 2013), medicamentos (MATTHEWS; HANISON; NIRMALAN, 2016), biotecnologia marinha (ABID et al., 2018), na avaliação de riscos de produtos químicos (SAUER et al.,

2017) e em doenças como o câncer, na qual o foco é no perfil e validação dessas técnicas para a detecção da doença utilizando tecido, soro, saliva, linhas celulares e/ou urina (RAI et al., 2018). Assim, neste projeto, será utilizado como campo de estudo duas abordagens das ciências ômicas para a análise de tecidos das lesões precursoras do câncer de colo de útero: a proteômica e a metabolômica.

1.4 Quimiometria aplicada a Ciências ‘Ômicas’

Com o avanço de métodos analíticos com alto desempenho e resolução, obteve-se a aquisição de uma grande quantidade de dados, especialmente nas áreas relacionadas às ciências ‘ômicas’. Consequentemente, é comum a coleta de uma ampla variedade de variáveis por amostra. Com isso, tornou-se cada vez mais importante a mineração dos dados adquiridos utilizando tratamentos estatísticos, visando extrair as informações mais relevantes e validadas para o respectivo estudo (XU; HOEFSLOOT; SMILDE, 2011) (SOUSA, 2013).

Atualmente, as análises multivariadas vêm contribuindo para esse fim, sendo bastante aplicada na área das ciências ômicas especialmente em metabolômica, com o objetivo de reduzir a dimensionalidade dos resultados obtidos (GORROCHATEGUI et al., 2016). Nas análises multivariadas, tanto a classificação quanto a distinção de entidades ou metabólitos responsáveis pela diferenciação dos grupos entre as amostras são feitas a partir da avaliação do conjunto da matriz de dados obtidos durante as análises realizadas. Assim, quando o interesse é verificar essas correlações, são empregados métodos não supervisionados como a análise de componentes principais – do inglês *Principal Component Analysis* (PCA) e métodos supervisionados como a análise discriminante por mínimos quadrados parciais – do inglês *Partial Least Squared Discriminant Analysis* (PLS-DA) (SUGIMOTO et al., 2012).

A análise de componentes principais consiste na transformação dos dados com alta dimensão para uma menor dimensão, programando-os em um subespaço de dimensões reduzidas, porém mantendo a maior variação possível dos dados originais. Esse processo repete-se até que os conjuntos de dados possam ser mostrados normalmente em duas ou três dimensões (NYAMUNDANDA; BRENNAN; GORMLEY, 2010). Com isso, a visualização das amostras é simplificada pela sua distribuição no espaço do componente principal (PC), utilizando os gráficos de pontuação. A distância Euclidiana entre as amostras individuais em *score plots* mostra o grau de variação

sistemática nos perfis de metabólitos entre as amostras. Já as *loading plots* demonstram a contribuição de metabólitos individuais relacionados a cada PC, como mostrado na Figura 4 (BOCCARD; VEUTHEY; RUDAZ, 2010).

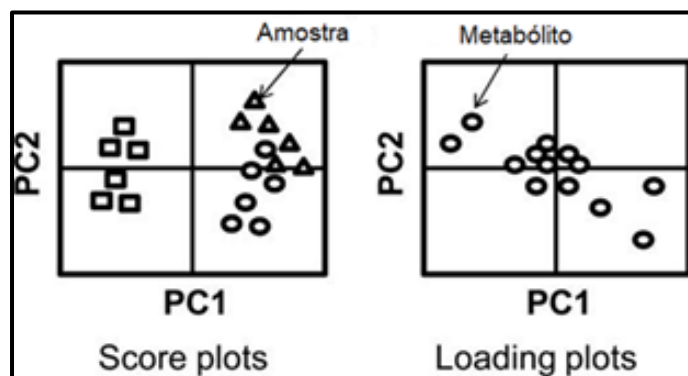


Figura 4 – Representação de métodos de análise de dados utilizados na metabolômica: PCA e PLS-DA. **Fonte:** SUGIMOTO et al., 2012.

Já a análise discriminante por mínimos quadrados parciais é um método de classificação supervisionado, onde a obtenção do agrupamento observado leva em consideração as classes previamente determinadas pela análise, ou seja, o agrupamento das amostras ocorre a partir de uma informação específica fornecida à análise (SANTOS, 2015). Similarmente às plotagens de carregamento no PCA, o PLS-DA também visa a redução de dimensionalidade; porém, o conjunto de amostras com variáveis multidimensionais são reduzidas as chamadas Variáveis Latentes (também chamadas de PCs). Essas sempre apontam na direção de maior variância sobre uma determinada informação fornecida ao sistema. Assim, no *loading plots* observa-se a covariância e a correlação entre os metabólitos juntamente com a classe estabelecida (Figura 4), isto é, o PLS-DA correlaciona a variância do espaço multidimensional (matrix X) com uma resposta informada (matriz Y) (SANTOS, 2015; SUGIMOTO et al., 2012; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001). De forma geral, o PLS-DA têm sido bastante utilizado para o aprimoramento de separação entre grupos distintos em metabolômica (BOCCARD; VEUTHEY; RUDAZ, 2010; FARIA et al., 2011).

1.5 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica bastante utilizada em algumas ciências ômicas em combinação com métodos de separação e com o auxílio da bioinformática (ESPINDOLA et al., 2010). Essa possibilita identificar uma multiplicidade de moléculas simultaneamente através da relação massa/carga (m/z); permitindo assim a determinação da massa molecular, caracterização estruturalmente das moléculas, além da realização de análises qualitativas e quantitativas referentes aos compostos da mistura a ser estudada (BANACH et al., 2017).

O espectrômetro de massas é composto por uma fonte de íons, que é responsável pelo processo de ionização dos analitos; um analisador de massas, onde ocorre o processo de separação de íons através da relação massa/carga (m/z), mediante aplicações de campos elétricos e/ou magnéticos; e o detector, que é responsável pela detecção e amplificação dos íons para então serem transformados em sinais elétricos e assim processados no sistema de dados (LANÇAS, 2009), conforme mostra a Figura 5.

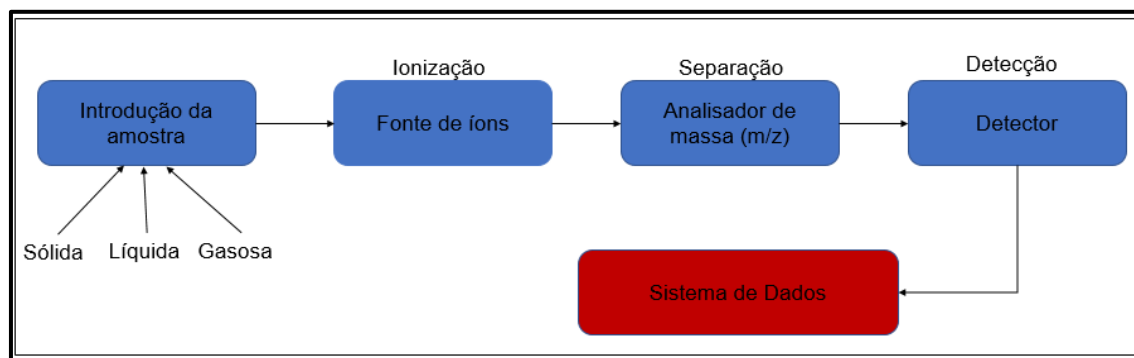


Figura 5 - Esquema dos principais componentes de um espectrômetro de massas.

Fonte: Adaptado de LANÇAS, 2009.

Atualmente, existe uma diversidade de fontes de ionização e analisadores de massas, os quais apresentam particularidades específicas que podem beneficiar a análise da classe de compostos desejados (ALBERICE, 2014). Em especial, para a análise de biomoléculas em espectrometria de massas, destaca-se as técnicas de ionização branda: ionização por *electrospray* – do inglês *Electrospray ionization* (ESI) e ionização/dessorção a laser auxiliada por matriz – do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI) (FENSELAU; DEMIREV, 2001); além de analisadores de massas sequencial (MS/MS), os quais permitem a análise dos aspectos estruturais de compostos devido a sua resolução, acurácia e limite de detecção (ALBERICE, 2014; AQUINO, 2012).

A ionização por *electrospray* (ESI) opera a pressão atmosférica e, conforme demonstrado na Figura 6, a solução que contém a amostra a ser analisada é inserida no capilar metálico, sendo submetida a um campo elétrico bastante alto atribuído pela fonte de alimentação. Devido ao campo elétrico aplicado, há o acúmulo de íons eletrolíticos positivos na ponta do capilar metálico formando um cone (cone de Taylor). Um fluxo contracorrente de gás nebulizador faz com que o solvente evapore reduzindo o diâmetro das gotículas em carga constante e, conseqüentemente, eleva a repulsão eletrostática entre as espécies carregadas, ocasionando a fissão das gotículas denominada de “explosão coulômbica”. Tal fenômeno produz gotículas menores e posteriormente a liberação dos íons, formando um “spray” de partículas carregadas gerando assim uma corrente eletrolítica (FENN et al., 1989; KEBARLE; TANG, 1993).

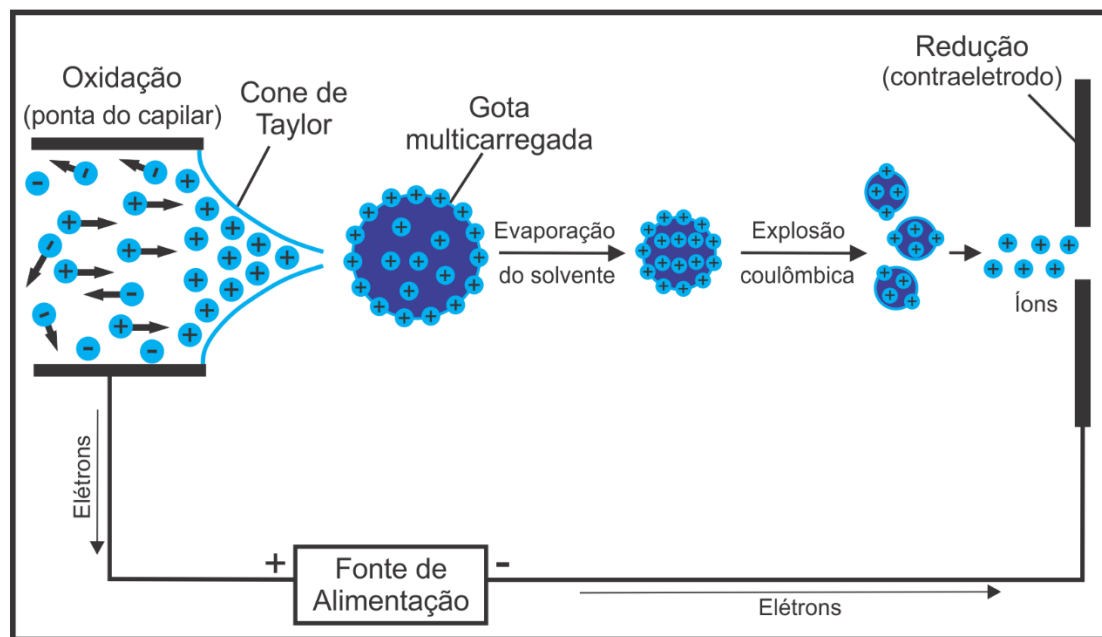


Figura 6 - Representação esquemática do funcionamento da fonte de ionização por ESI.
Fonte: Adaptado de CANTÚ et al. (2008) e ALBERICE (2014).

Um componente essencial em um espectrômetro de massas é o analisador de massas devido a sua função de separar os íons de acordo com a razão m/z . Atualmente, existem vários tipos de analisadores de massas, sendo os mais utilizados o *ion trap* (IT), quadrupolo (Q), tempo de voo (*Time-of-Flight* – TOF), FT-ICR (*Fourier-transform ion cyclotron resonance*) e *orbitrap* (OT). Cada um desses analisadores apresenta particularidades ou vantagens e desvantagens, que o tornam mais indicado para uma dada análise ou até mesmo para uma determinada classe de compostos (ALBERICE, 2014).

Dentre os mais amplamente utilizados, encontram-se os tipos quadrupolo e o *ion trap*. O tipo quadrupolo é constituído por quatro barras metálicas sólidas (eletrodos) paralelas ao feixe de íons. Este dispositivo utiliza campos elétricos oscilantes, produzidos pelas barras, para seleccionar os íons através da sua estabilidade de acordo com a razão m/z , separando-os no decorrer do percurso no centro da região dos quatro cilindros do quadrupolo (Figura 7). Um campo elétrico oscilante é produzido entre as barras através da aplicação da voltagem de corrente direta (DC – *direct-current*) e rádio frequência (RF). Dependendo das variações dos valores de DC e RF, os íons adquirem uma certa oscilação eletrostática que influencia em sua trajetória, podendo ser estabilizada ou desestabilizada. Sendo assim, apenas íons com uma dada m/z e uma determinada condição de DC e RF terão “oscilações estáveis” e atravessarão o quadrupolo (íon ressonante). Os demais íons com “oscilações instáveis” entrarão em contato com os polos e serão descartados (íon não ressonante). Com isso, o quadrupolo funciona como um filtro, permitindo que os íons com diferentes valores de m/z em seus respectivos tempos sejam detectados (HOFFMANN; STROOBANT, 2007; PAVIA et al., 2010; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

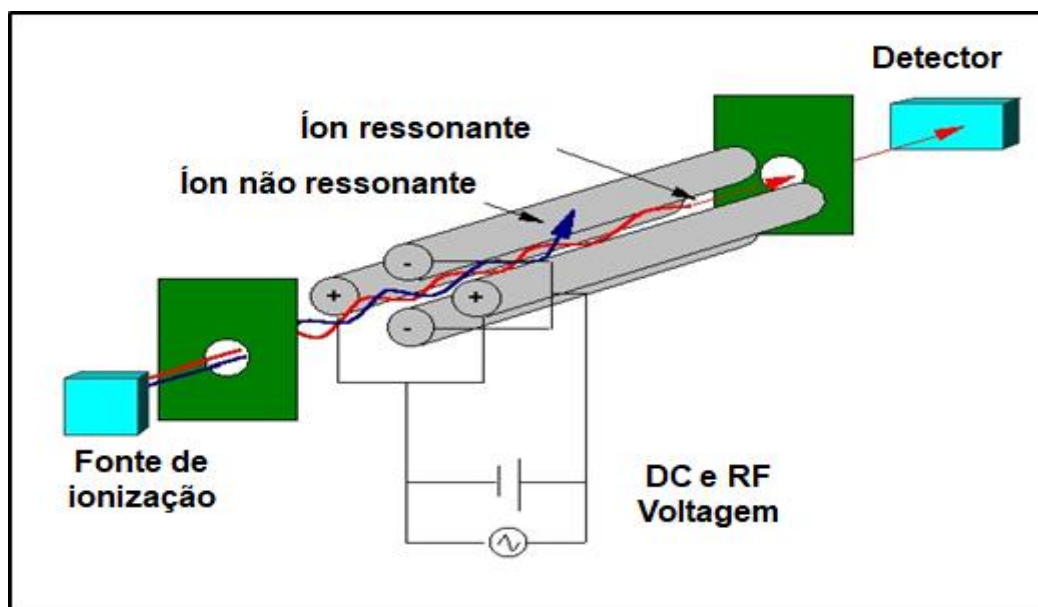


Figura 7 - Representação esquemática do analisador quadrupolo.

Fonte: Adaptado de nthu.edu.tw

Já os analisadores do tipo armadilha de íons (do inglês *ion trap*) possuem um princípio de funcionamento semelhante ao quadrupolo; entretanto, os íons não são descritos pela trajetória a partir do ambiente quadrupolar e sim são aprisionados dentro

dele. Neste, tem-se um campo elétrico no interior fazendo com que os íons permaneçam em uma órbita estável. O potencial de RF é empregado e com isso os íons são desestabilizados e liberados para fora do analisador, através dos valores de m/z (SCHALLEY, 2000).

As áreas de pesquisas como a proteômica e a metabolômica têm empregado espectrômetros de massas que cada vez mais necessitam ter parâmetros associados a características como a acurácia, resolução, sensibilidade, precisão entre as diferentes análises (HU et al., 2005). Nesse sentido, um analisador que vem se destacando nesses princípios é o *Orbitrap* (Figura 8), que possui em sua estrutura um eletrodo externo no formato de barril e um central coaxial fusiforme. Estes eletrodos são conectados com fontes elétricas independentes, que fornecem um campo com potencial do tipo quadro-logarítmica (HU et al., 2005; KAWAHARA, 2015). Após injetados, os íons são aprisionados em órbita, onde iniciam a oscilação em movimento harmônico no decorrer do eletrodo axial. A movimentação dos íons entre os eletrodos provoca uma corrente elétrica que consegue ser medida e por conseguinte, transformada em espectro de massas a partir da equação da transformada de Fourier (HU et al., 2005; KAWAHARA, 2015).

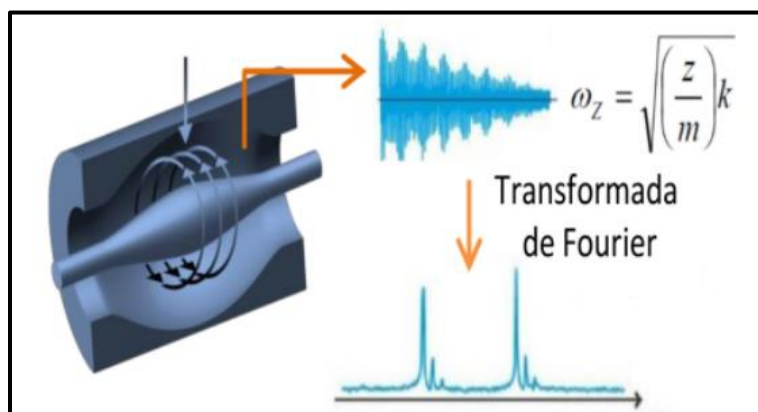


Figura 8 – Representação do analisador *Orbitrap*, onde a detecção da corrente elétrica gerada pelo movimento dos íons é convertida em um espectro de massas através da transformada de Fourier.

Fonte: KAWAHARA (2015)

Adicionalmente, é possível combinar dois ou mais analisadores em um dado equipamento de massas, denominado de híbridos, para a melhoria de propriedades entre as análises das amostras estudadas (VESSECCHI et al., 2011). A técnica que usa esse tipo de sistema é a espectrometria de massas sequencial ou em *tandem* (MS/MS),

utilizada com frequência para fragmentar metabólitos, proteínas e peptídeos, fornecendo informações sobre os compostos ou biomoléculas analisadas (DASS, 2007; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Finalizando a descrição do espectrômetro de massas, tem-se o detector cuja função é a detecção e amplificação do sinal da corrente de íons proveniente do analisador, para assim transferir esse sinal para um sistema de processamento de dados (KAWAHARA, 2015). Os mais utilizados são os multiplicadores de elétrons e os fotomultiplicadores. No primeiro, há diversas placas coletoras de íons em série mantidas em potencial crescente. Quando o íon atinge à superfície do multiplicador, há emissão de elétrons. Estes, por sua vez, são atraídos por uma segunda placa e posteriormente, novos elétrons são gerados. O processo continua até a chegada na extremidade do multiplicador, formando uma cascata de elétrons que resulta no ganho total de uma corrente elétrica que é analisada e registrada pelo sistema de dados (DASS, 2007; HOFFMANN; STROOBANT, 2007). Já a placa de conversão fotomultiplicadora possui o princípio parecido com a multiplicadora de elétrons, onde os íons se chocam na placa, obtendo a emissão dos elétrons. Porém, quando há esse choque no detector resulta na liberação de fóton e então são amplificados. Assim, os elétrons são detectados a partir de uma fotomultiplicadora, operando também em cascata de elétrons semelhante à multiplicadora (DASS, 2007; HOFFMANN; STROOBANT, 2007; KAWAHARA, 2015).

Capítulo II

Análise Proteômica

2. ANÁLISE PROTEÔMICA

2.1 Proteômica

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes contidas nos seres vivos, sendo consideradas biofuncionais de uma grande significância devido conduzirem uma série de funções biológicas nos organismos vivos (MORAES, C. S.; OLIVEIRA JUNIOR, F. O. R; MASSON, G., 2013). Para entender sobre os processos que modulam a atividade proteica e suas propriedades, é necessário conhecer o conjunto de proteínas que são expressas por um sistema celular ou em um organismo quando estão sujeitos à determinadas condições, definido como o proteoma (BARBOSA et al., 2012; WILKINS et al., 1996). Neste contexto, o termo proteômica refere-se ao conjunto de técnicas utilizadas para caracterizar qualitativamente e quantitativamente o proteoma de um determinado organismo, sendo este responsável direto ou indiretamente pelo controle de quase ou todos os processos biológicos (ALMEIDA, 2017; AQUINO, 2012; BARBOSA et al., 2012).

As informações contidas no proteoma de uma amostra podem provir da análise de proteínas em diferentes estratégias, sendo essas constituídas basicamente por três principais abordagens: *top-down*, *middle-down* e *bottom-up*. Na abordagem *top-down*, as proteínas intactas são identificadas diretamente por espectrometria de massas (MS), sem a realização de processos de clivagem proteolítica. Na *middle-down*, a identificação das proteínas ocorre através de seus peptídeos, tendo uma cadeia de aminoácidos longa (50-60 aa). Já a *bottom-up* consiste também em analisar as proteínas a partir dos peptídeos obtidos pela digestão proteolítica, porém estes possuem uma cadeia de aminoácidos mais reduzida (4-20 aa) (Figura 9) (COORSSEN; YERGEY, 2015; SALVATO; CARVALHO, 2010; SIDOLI; GARCIA, 2017).

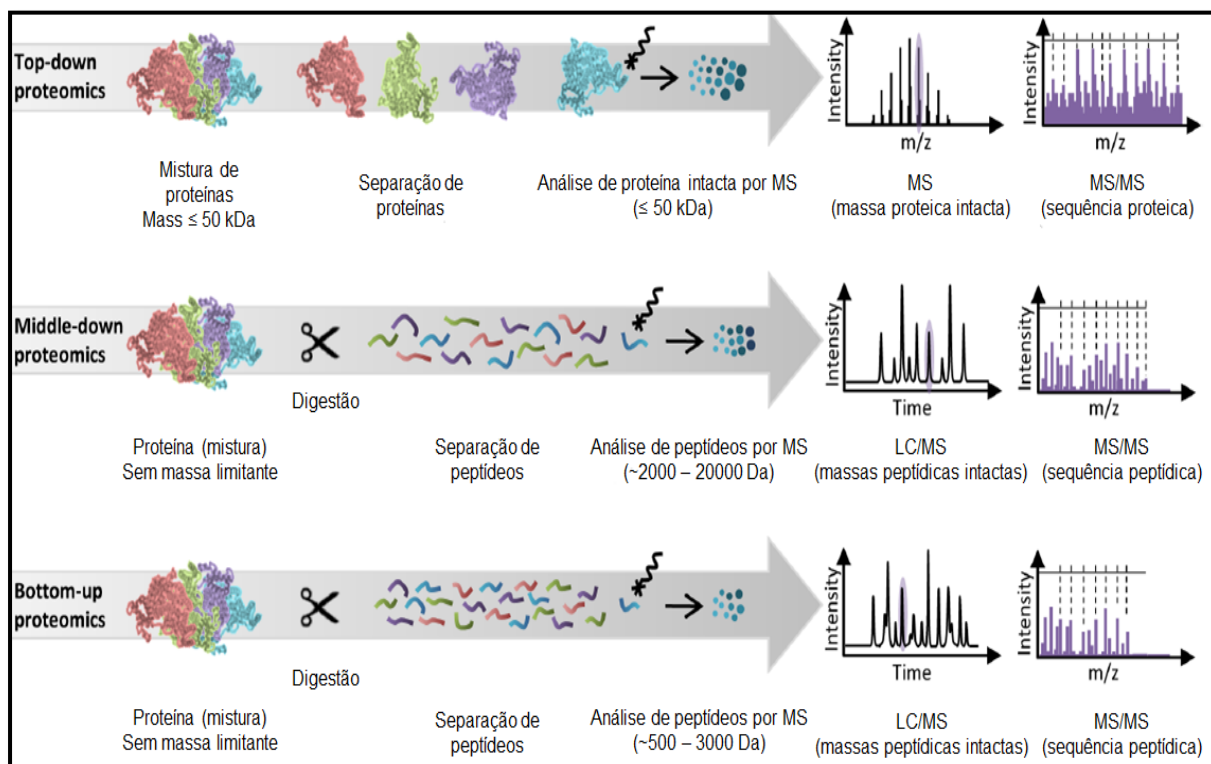


Figura 9 – Representação geral das três principais abordagens proteômicas.

Fonte: Adaptado de SWITZAR; GIERA; NIESSEN (2013).

Entre os métodos acima citados, o mais empregado em proteômica é a abordagem *bottom-up*, especialmente a *shotgun proteomics*. Nesta, as proteínas são extraídas de misturas complexas, submetidas a digestão proteolítica, tendo a tripsina como principal enzima utilizada nesse processo. Posteriormente, os peptídeos são obtidos, fracionados por cromatografia líquida (LC) e analisados por espectrometria de massas sequencial (MS/MS). A partir dos dados resultantes dessa análise, são utilizadas ferramentas computacionais tanto para identificação quanto para quantificação desses peptídeos e inferência das proteínas contidas na amostra original (HUDLER; KOCEVAR; KOMEL, 2014; LEAL, 2019; MOTOYAMA; YATES, 2008; SWITZAR; GIERA; NIESSEN, 2013).

Em princípio, essa abordagem possui algumas vantagens (e.g. sensibilidade e reprodutibilidade) mesmo para proteomas complexos como os de soro e plasma (BARBOSA et al., 2012). De modo geral, a *shotgun proteomics* está sendo muito utilizada em estudos relacionados a conteúdo proteico de organismos humanos (ALMEIDA, 2017; AQUINO et al., 2014; MANTSIOU et al., 2019), animais (BRAGA et al., 2014) e também vegetais (LOPES et al., 2019), obtendo resultados relevantes.

Vale ressaltar que o proteoma possui uma grande complexidade devido ser dinâmico, ou seja, seu perfil varia dependendo do estado fisiológico e as fases de diferenciação celular (BARBOSA et al., 2012). Diante de tal fato, é preciso utilizar ferramentas analíticas robustas que forneçam a separação de proteínas em alta resolução para determinado tipo de amostra. Dentre as técnicas mais usadas em análise proteômica, tem-se eletroforese unidimensional (1-DE ou SDS-PAGE) e bidimensional (2-DE), eletroforese em gel diferencial (2-DIGE), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) e eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas (CE-MS) (ALBERICE, 2014).

Devido as proteínas serem moléculas muito influenciadas quando um organismo é acometido por uma doença, estas são evidenciadas para a busca de biomarcadores (*i.e.* indicadores de alterações do estado fisiológico utilizado para identificar a presença ou o processo de desenvolvimento de algumas patologias). Logo, tais técnicas empregadas em proteômica podem ter como propósito analisar uma variedade de tipos de amostras contendo alterações no padrão de expressão proteica relacionada a patologias (ALBERICE, 2014; AQUINO, 2012; BARBOSA et al., 2012; RACHAKONDA; PAN; LE, 2004).

2.2 Proteômica aplicada ao câncer

Estudos voltados à análise de proteínas são importantes para o entendimento das suas interações com processos celulares e o ambiente externo. Assim, trabalhos utilizando essa abordagem podem fornecer informações sobre as funções e atividades proteicas como as modificações pós-traducionais, degradação e interações proteína-proteína, colaborando assim para um melhor entendimento dos mecanismos correlacionados a doenças (BARBOSA et al., 2012; WEI, 2018).

As proteínas são consideradas efetores do comportamento celular e, consequentemente, sua expressão e atividade compreendem a base molecular tanto de doenças como da saúde do ser humano (BARUTO et al., 2009). Especificamente com relação ao câncer, as proteínas expressas podem sinalizar processos referentes ao crescimento do tumor, à invasão, a metástase, a interação das células circundantes além da resposta à terapia (ZHANG et al., 2009). Desvendar as mudanças ocorridas na rede de sinalização de proteínas podem auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na carcinogênese, progressão e metástase; fornecendo características que podem ser

únicas para os diversos tipos e subtipos específicos de câncer (SHRUTHI; VINODHKUMAR; SELVAMANI, 2016; ZHANG et al., 2009).

Os avanços na pesquisa sobre proteomas na área biomédica têm demonstrado contribuições interessantes, principalmente com relação a biomarcadores que averiguam patologias crônicas como o câncer. Um exemplo disso é o estudo realizado por Panis e colaboradores (2019), que evidencia as estratégias proteômicas relacionadas a complexidade das redes de sinalização nesses casos, além de apontar possíveis candidatos à alvos terapêuticos.

Além disso, tem se verificado na literatura resultados satisfatórios relacionados a expressão diferencial de proteínas de diversos tipos de câncer, incluindo o de próstata (MARTINY et al., 2018), gástrico (LIU et al., 2014; AQUINO et al., 2014), de pulmão (KIM et al., 2015), leucemia (HOFF et al., 2019), colorretal (ALMEIDA et al., 2017), de mama (PANIS et al., 2016), de ovário (CRUZ et al., 2017), dentre outros. Adicionalmente, existem uma ampla variedade de tipos de amostras empregadas nesses trabalhos como o soro (GAJBHIYE et al., 2017), plasma (CORRÊA et al., 2017), urina (CHEN et al., 2018), tecido (ZHAN et al., 2018) e saliva (KATAKURA et al., 2015).

Alguns estudos voltados para candidatos a biomarcadores para o câncer de colo de útero foram realizados com base em perfis proteômicos. Um exemplo é o trabalho de Zhao e colaboradores (2015) utilizando as técnicas 2-DIGE e MALDI-TOF/TOF em amostras de tecidos de pacientes com câncer cervical, neoplasia intraepitelial cervical e amostras controles; que demonstrou proteínas diferencialmente expressas entre tais tecidos, no qual a S100A9, eEF1A1 e PKM2 se destacaram como fortes candidatas a marcadores proteicos de diagnóstico precoce.

Com relação as lesões precursoras do CCU, um estudo realizado por Sheke, G. (2007), utilizando SELDI-TOF-MS para analisar amostras de soros de controles e pacientes com NIC 1, 2 e 3 e também CCU em diferentes estágios, mostrou que diversas proteínas/peptídeos sofreram alterações tanto no início desse tipo de câncer como durante seu desenvolvimento. Dentre elas, seis proteínas com m/z de 8929,31; 7930,52; 9127,31; 8141,01; 7963,06 e 9280.63 respectivamente, foram consideradas como um grupo de biomarcadores relacionados a origem e a progressão do câncer de colo de útero (SHEKE, G., 2007).

Já em um trabalho realizado por Uleberg e colaboradores (2011), utilizou-se a LC-MS/MS para analisar amostras de biópsias de punção cervical de mulheres com diagnóstico de NIC 2 e NIC 3 a fim de investigar proteínas expressas diferencialmente

entre essas lesões. Como resultado, foram identificadas 114 proteínas diferenciais, sendo a proteína citoqueratina 2 um grande alvo para marcador proteico de classificação das NICs (ULEBERG et al., 2011). Diante do exposto, trabalhos relacionados ao estudo proteômico podem contribuir para a melhoria de diagnósticos e prognósticos de doenças como o câncer bem como suas lesões precursoras.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto é integrado à pesquisa intitulada “Avaliação das características epidemiológicas e moleculares de mulheres tratadas com lesões precursoras do câncer de colo de útero no Amazonas”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) (Anexo A) e da Fundação de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON) (Anexo B) sob N° dos pareceres 2.464.202 e 2.372.935, respectivamente. Em adição, também se encontra cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob número A49A7F6 (Anexo C).

2.3.1 Seleção de pacientes

Para este trabalho foram selecionadas pacientes diagnosticadas com lesões precursoras do câncer de colo de útero, levando em consideração os seguintes aspectos:

- **População de estudo**

Foram inseridas na pesquisa dez pacientes diagnosticadas com neoplasias intraepiteliais cervicais de grau 2 e 3 (NIC 2 e NIC 3), que estiveram em tratamento durante o tempo do estudo na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON).

- **Local do estudo**

As coletas das amostras foram realizadas na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON). Posteriormente, estas foram armazenadas e preparadas no Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz Amazônia). As análises proteicas das amostras foram realizadas no Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico - UFRJ (LADETEC), especificamente no Laboratório de Proteômica (LABPROT).

- **Crítérios de inclusão**

Foram inclusas no estudo proteômico apenas pacientes com idade acima de 40 anos devido haver outro projeto em paralelo a respeito de pacientes abaixo de 40 anos. Estas pacientes concordaram em participar do projeto tendo indicação cirúrgica para o procedimento de conização pela equipe clínica da Fundação CECON e com laudo histopatológico pré e pós operatório de neoplasia intraepitelial de alto grau (NIC 2 e NIC 3). Além disso, as pacientes deviam ser virgens de tratamento cervical.

- **Crítérios de exclusão**

Foram excluídas da pesquisa pacientes grávidas ou que não apresentavam um estado clínico favorável para a coleta do material cervical. E ainda, pacientes que possuem a presença ou histórico de qualquer tipo de carcinoma no momento da coleta das lesões precursoras, não foram incluídas no projeto.

2.3.2 Coleta de dados

As pacientes que atenderam aos critérios de inclusão no estudo foram abordadas durante a internação na FCECON. Estas foram informadas sobre o estudo a ser realizado e posteriormente convidadas a participar. Aquelas que confirmaram a participação no projeto, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A). Esse foi obtido de tal maneira que a confidencialidade das mesmas foi devidamente preservada, seguindo as normas do conselho de ética. As pacientes voluntárias foram entrevistadas respondendo a um questionário clínico (Apêndice B) com o intuito de relacionar a situação particular de cada paciente com os dados experimentais. Adicionalmente, foi averiguado também o prontuário, afim de obter informações complementares à parte clínica e ao tratamento. No total, foram selecionadas 10 pacientes para a realização do estudo.

2.3.3 Coleta e preservação das amostras

As amostras de tecido cervical foram coletadas sob a orientação de um cirurgião ginecologista e/ou por um membro da equipe cirúrgica da FCECON. Estas foram obtidas durante o processo cirúrgico de conização, no qual foram coletados fragmentos do cerne das lesões precursoras e das margens adjacentes (Figura 10). De maneira geral, as

amostras coletadas foram rapidamente armazenadas em microtubos livres de DNase e RNase, transportadas em gelo e, posteriormente, armazenadas no freezer -80°C do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz Amazônia) até a realização das análises.

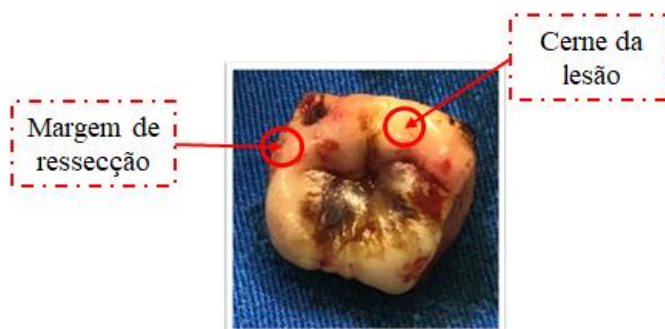


Figura 10 – Colo do útero de uma paciente definindo a área com a cerne da lesão e a margem de ressecção.

2.3.4 Estudo proteômico das NICs de alto grau

2.3.4.1 Pulverização e extração proteica

Primeiramente, as amostras de tecidos coletados da lesão precursora e margens adjacentes foram maceradas em nitrogênio líquido. Nestas, foi inserido 100 µL do reagente RapiGest® (Waters) a uma concentração de 0,1% (p/v) diluído em bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃), de acordo com a massa (mg) obtida do fragmento macerado. Em seguida, visando o melhor rendimento da extração proteica, as amostras foram sujeitas a uma agitação (vórtex) durante alguns minutos sendo deixadas *overnight* em baixa temperatura. Passado esse período, foi realizado uma centrifugação e o sobrenadante foi coletado. O conteúdo proteico presente em cada amostra foi quantificado a partir do ensaio fluorimétrico Qubit® 3.0, de acordo com as instruções cedidas do fabricante (Invitrogen).

2.3.4.2 Eletroforese unidimensional

Para a realização da eletroforese unidimensional, foram utilizados 30 µg de proteínas de cada amostra. O volume equivalente a essa quantidade de proteínas foi diluído no tampão Laemmli (duas vezes) com Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 10%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol a 1%. Em seguida, as amostras foram

submetidas a agitação (vórtex) por alguns segundos e a centrifugação durante alguns minutos. Após, as amostras foram incubadas em banho seco a 100°C no período de 5 minutos. Foi utilizado também 10 µL de marcador molecular com padrões pré-corados (n°. catálogo 161-0317, Biorad®). O gel de poliacrilamida preparado foi a 15% (Gel de corrida: 1,15 mL de água destilada, 2,5 mL de 30% acrilamida mix, 1,25 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 50 µL de 10% SDS, 50 µL de 10% de persulfato de amônio e 2,0 µL de TEMED). O gel de empilhamento foi a 5% (1,4 mL de água destilada, 330 µL de 30% acrilamida mix, 250 µL de 1,5M Tris pH 8,8, 20 µL de 10% SDS, 20 µL de 10% de persulfato de amônio e 2,0 µL de TEMED), de acordo com as instruções cedidas do fabricante (Mini Protean II). Como tampão de corrida, utilizou-se Tris-HCl 0,25 M, glicina 1,92 M e SDS 0,1%. A eletroforese foi realizada a 80 volts e 15 mA/gel, durante 2 horas.

2.3.4.3 Coloração com Coomassie R-250

Os géis foram removidos das placas e posteriormente foram imersos em uma solução fixadora contendo 40% de etanol, 10% de ácido acético e 50% de água destilada por cerca de um dia. Após esse tempo, os géis foram corados durante 3 horas com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,2%, dissolvido em ácido acético 10%, etanol 40% e água destilada. Por conseguinte, estes foram descorados em solução de ácido acético glacial, etanol e água destilada 1:4:5 (v/v/v) durante alguns minutos. Em seguida, a solução descorante foi descartada e adicionou-se água destilada visando uma completa descoloração. Por fim, o gel foi escaneado.

2.3.4.4 Digestão proteica em solução

Para a digestão proteica em solução foram utilizados 100 µg de proteínas de cada amostra. Estas foram reduzidas a peptídeos, onde inicialmente adicionou-se o DTT (ditiotretol) a 50 mM para uma concentração final de 10 mM, sendo posteriormente incubadas na temperatura de 60°C durante 60 minutos. Após o resfriamento das amostras e em ausência de luz, foi adicionado IAA (iodoacetamida) a 150 mM por 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se novamente o DTT 50 mM para uma concentração final de 4,5 mM. A digestão proteica foi realizada mediante o uso da enzima tripsina (Promega) na proporção de 1/50 (p/p) de enzima/substrato. Em seguida, as amostras foram incubadas a temperatura de 37°C durante 20 horas. No outro dia, adicionou-se ácido trifluoroacético (TFA) a 10% (v/v) com uma concentração final de 1% (v/v) para paralisar a reação, deixando as amostras em temperatura ambiente durante 50 minutos.

Por fim, estas foram centrifugadas a 14000 rpm, 4°C durante 30 minutos com o intuito de retirar possíveis materiais insolúveis (AQUINO, 2012).

2.3.4.5 Preparação das amostras para análise nLC – MS/MS

Os peptídeos resultantes de cada amostra foram dessalinizados utilizando mini-colunas empacotadas com resina de fase reversa Poros® R2 (Applied Biosystems). Em suma, estas colunas foram ativadas duas vezes com acetonitrila 100% durante 15 minutos a 25°C e equilibradas três vezes com TFA 1%. As amostras preparadas em TFA 1% foram inseridas nas colunas e lavadas com solução de TFA 0,1%. A eluição dos peptídeos ocorreu mediante a aplicação da solução de acetonitrila 70% em TFA 0,1%. Posteriormente, os peptídeos foram concentrados no *Speed Vacuum* (Thermo Fischer Scientific) sendo ressuspensos em ácido fórmico 0,1%, submetidos a agitação em vórtex e, por fim, quantificados pelo ensaio fluorimétrico – Qubit 3.0® (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

2.3.4.6 Aquisição de dados por nanocromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas sequencial (nLC – MS/MS)

Em duplicata técnica, os peptídeos foram sujeitos a um sistema de nanocromatografia Easy-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific). Estes foram inseridos em uma pré-coluna de fase reversa com fase estacionária ReprosilPur C18 (2 cm × 150 µm id × 5 µm) com uma vazão de 5 µL/min. Posteriormente, os peptídeos foram separados em uma coluna analítica de fase reversa com fase estacionária ReprosilPur C18 (25 cm × 75 µm id × 3 µm) contendo a taxa de fluxo constante de 300 nL/min. Os peptídeos foram eluídos no decorrer da coluna com um gradiente linear de 2 a 20% de fase B (95% de acetonitrila, 0,1% de ácido fórmico) por 133 min, de 20 a 40% de fase B para 34 min e de 40 a 95% de fase B por 5 min mantidos em 95% por 8 min. À medida que os peptídeos foram sendo fracionados, estes foram inseridos diretamente no espectrômetro de massas Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific).

A aquisição dos espectros foi efetuada no modo *data dependent acquisition* (DDA), sendo alternado automaticamente entre a aquisição do *full scan* (MS1) e MS/MS (MS2), na faixa de *m/z* 200-2000 com uma lista de exclusão dinâmica de 45 segundos e espectros de varredura completa com resolução de 35,000. Os quinze íons mais intensos com carga ≥ 2+ foram isolados e fragmentados por dissociação por colisão em alta energia (HCD), usando uma energia normalizada de 30 e resolução de 17,500 nas

varreduras de MS/MS. Os parâmetros utilizados para a operação do espectrômetro de massas foram: voltagem no spray de 2,60 kV, fluxo zero de sheath e auxiliary gas, temperatura do capilar de 250 °C, habilitação de *predictive automatic gain control* (AGC) *target* e o nível de 70% de RF na S-lens. A obtenção dos espectros de massas e o controle dos gradientes dos solventes foi realizado por meio do programa Xcalibur (Thermo-Scientific).

2.3.4.7 Análise dos dados

Os dados clínicos e socioeconômicos das pacientes do presente estudo foram submetidos a análise estatística descritiva utilizando o *software* MiniTab 18, sendo apresentados por meio de tabela de frequência e para as variáveis quantitativas foi realizado os cálculos de média, mediana, desvio padrão, máximo e mínimo.

Para abordagem proteômica, foi utilizado o *software PatternLab for proteomics* (PL) para uma análise mais ampla dos dados obtidos. Nessa plataforma, há diversos módulos referentes à análise de dados de proteínas, os quais incluem a formatação de bases de dados de sequências, parâmetros estatísticos para a correspondência entre os espectros de peptídeos, informações quantitativas, exibição dos resultados em diversos formatos de gráfico, dentre outros (CARVALHO et al., 2016).

No presente estudo, as sequências proteicas do *Homo sapiens* foram obtidas do UniProt no dia 10 de setembro de 2019. Utilizou-se um banco de referência contendo 74449 sequências proteicas. Posteriormente, preparou-se um banco de dados do tipo “*target-decoy*”, o qual concede estimativas falsas positivas com a finalidade de obter identificações com confiabilidade representativa na análise estatística (AQUINO, 2015; ELIAS; GYGI, 2010; LEAL, 2019), bem como inclui as sequências de 127 contaminantes comuns a experimentos de espectrometria de massas (AQUINO, 2015; LEAL, 2019).

A fim de comparar os espectros de massas sequenciais (MS/MS) gerados experimentalmente com os espectros teóricos gerados através do banco de dados utilizou-se a ferramenta de busca *Comet* (CARVALHO et al., 2016; ENG; JAHAN; HOOPMANN, 2013). De maneira geral, essa busca limitou-se a candidatos semi-trípticos, levando em consideração até duas falhas de clivagem no sítio enzimático, a carbamidometilação da cisteína foi atribuída como uma modificação fixa e a oxidação da metionina como variável. Perante a cada espectro analisado nesta etapa, considerou-se uma tolerância de 40 ppm de erro e o *XCorr* foi utilizado como métrica de semelhança

primária. Além disso, foi utilizado o *Search Engine Processor – SEPro* para a validação das identificações proteicas, que agrupou as identificações de acordo com o estado de carga do precursor e os valores estatísticos provenientes do *Comet* (e.g. $XCorr$, ΔCN); gerando assim um discriminador Bayesiano entre as identificações *não-decoys* e *decoys*. Logo, a lista final foi gerada considerando esse discriminador e determinando um *false discovery rate* (FDR) em torno de 1%. Adicionalmente, os resultados foram pós-processados para que fossem aceitas apenas sequências com um mínimo de seis aminoácidos, candidatos prováveis com menos de 10 ppm de erro e uma métrica de semelhança primária mínima de 1,8 para proteínas identificadas com um único espectro.

Já a quantificação foi realizada no modo livre ou isenta de marcação (*label-free*) utilizando os valores dos cromatogramas de íons extraídos (XICs), na qual um ou mais valores de m/z referente a um determinado peptídeo é “extraído” do cromatograma, sendo a intensidade do íon precursor plotada em um gráfico no decorrer do tempo (Figura 11). Para obtenção do XIC, calculou-se a área abaixo da curva simbolizada pelos pontos plotados, de acordo com os seguintes parâmetros: número mínimo de peptídeos – 2, considerando apenas peptídeos únicos; número mínimo *MS1 Count* – 3 pontos para a curva (AQUINO, 2015; ONG; MANN, 2005).

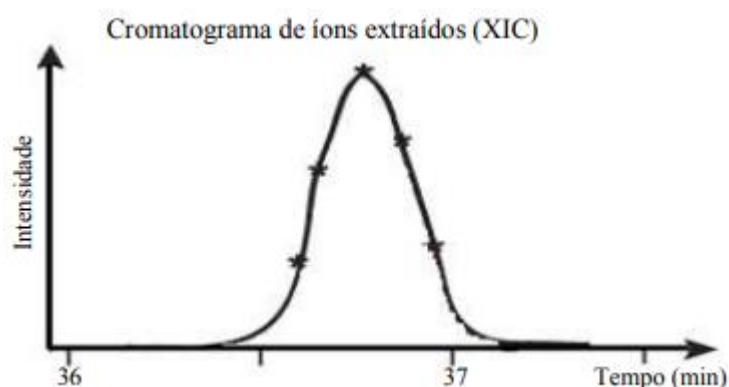


Figura 11 - Representação de um cromatograma de íons extraídos (XIC). **Fonte:** (AQUINO, 2015; ONG; MANN, 2005)

Posteriormente, foi realizada uma análise diferencial entre os distintos grupos estudados, isto é, NIC 2 e NIC 3 e as respectivas margens adjacentes, com o intuito de buscar as proteínas diferencialmente abundantes ou compartilhadas entre tais grupos utilizando o módulo Diagrama de Venn presente no PL (CARVALHO et al., 2016), sendo considerada apenas proteínas encontradas em duas réplicas biológicas em ambas as condições. Empregou-se também o módulo *Gene Ontology* com a finalidade de obter

informações acerca das funções das proteínas identificadas.

Além disso, algumas proteínas identificadas nesse estudo foram submetidas à análise de interação de proteínas utilizando o *software* STRING versão 11.0 (disponível em: <https://stringdb.org/>). O *software* STRING é um banco de dados que propõe coletar, pontuar e integrar todas as fontes à disposição sobre informações de interação proteína-proteína e completá-las com previsões computacionais a fim de obter uma rede global ampla e objetiva, contendo tanto interações diretas (físicas) quanto interações indiretas (funcionais) (SZKLARCZYK et al., 2019).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Características gerais dos indivíduos para o estudo proteômico

Algumas características das mulheres que participaram da pesquisa relacionadas a fatores de risco para NIC 2 e NIC 3 foram levadas em consideração para a escolha dessas pacientes. A idade média das mulheres selecionadas para o estudo foi de 51 anos. No total, foram obtidas cinco amostras de tecidos com NIC 2 e cinco amostras de tecidos com NIC 3, ambas com suas margens adjacentes (Quadro 1).

Quadro 1 – Características gerais das mulheres envolvidas no estudo proteômico.

Pacientes	Amostras	Siglas	Idade	Tipo de amostra	Diagnóstico histopatológico
1	1	1L	54	Lesão	NIC 3
1	2	2L	-	Margem	-
2	3	3L	66	Lesão	NIC 2
2	4	4L	-	Margem	-
3	5	5L	47	Lesão	NIC 3
3	6	6L	-	Margem	-
4	7	7L	58	Lesão	NIC 3
4	8	8L	-	Margem	-
5	9	9L	43	Lesão	NIC 3
5	10	10L	-	Margem	-
6	11	11L	48	Lesão	NIC 2
6	12	12L	-	Margem	-
7	13	13L	67	Lesão	NIC 2
7	14	14L	-	Margem	-
8	15	17L	42	Lesão	NIC 2

8	16	18L	-	Margem	-
9	17	19L	51	Lesão	NIC 3
9	18	20L	-	Margem	-
10	19	21L	52	Lesão	NIC 2
10	20	22L	-	Margem	-

Com relação ao perfil socioeconômico Tabela 2 das mulheres, observou-se que grande parte das mulheres afirmaram ser casadas (30%) e solteiras (30%). Quanto a escolaridade, 50% (5/10) possuem o ensino médio completo além disso, 50% (5/10) também tem renda de até 1 salário mínimo.

Tabela 2 – Perfil socioeconômico das mulheres envolvidas no estudo proteômico.

Variáveis	F	f (%)
<i>Estado civil</i>		
Casada	3	30%
Divorciada	1	10%
Solteira	3	30%
União estável	2	20%
Viúva	1	10%
<i>Escolaridade</i>		
Ensino Fundamental Completo	2	20%
Ensino Fundamental Incompleto	1	10%
Ensino Médio Completo	5	50%
Ensino Médio Incompleto	1	10%
Superior Completo	1	10%
<i>Renda familiar</i>		
Até 1 salário mínimo	5	50%
Até 2 salários mínimos	2	20%
Até 3 salários mínimos ou mais	3	30%

f: Frequência; f (%): Frequência relativa

No trabalho realizado por Miranda e colaboradores (2018), o qual relatou o perfil epidemiológico de mulheres submetidas ao exame colpocitológico em Goiás, demonstrou-se que a maioria das mulheres participantes do estudo tinham baixa escolaridade, sendo considerado um fator de risco; uma vez que ao sinalizar o baixo conhecimento da doença, criam-se barreiras impeditivas (como medo e vergonha) e afeta o rastreio do câncer ou das lesões precursoras, tornando esse grupo mais vulnerável, como encontrado também em nosso estudo.

Além disso, observou-se que as mulheres tinham baixa renda familiar e isso influencia em sua saúde, no que diz respeito a ter acesso aos serviços de saúde e

condições de moradia e educação, pois de acordo com Melo e colaboradores (2019) uma maior renda familiar possibilita um acesso maior aos meios de comunicação e também a serviços de saúde como consultas particulares, sem longo tempo de espera.

A partir dos resultados mostrados na Tabela 3, foi possível observar que a média da idade das mulheres relacionada a primeira relação sexual foi de 17 anos ($DP \pm 3,27$ anos). Já a idade média da primeira gestação foi de 23 anos ($DP \pm 4,28$ anos). Com relação aos partos normais, notou-se uma média de aproximadamente 3 partos ($DP \pm 2,47$ anos), sendo 8 o número máximo de partos normais.

Tabela 3 – Perfil clínico das mulheres envolvidas no estudo proteômico (Parte 1).

Variáveis	Média	Mediana	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo
Idade da 1ª relação sexual	17.3	17	3.27	11	23
Idade da 1ª gestação	23.1	22.5	4.28	17	30
Nº total de abortos	0.4	0	0.69	0	2
Nº de partos normais	2.9	2.5	2.47	0	8
Nº de partos cesáreos	0.7	0	1.06	0	3

Analisando a Tabela 4, foi possível notar que nenhuma dessas mulheres tinham o hábito de fumar (100%), 50% (5/10) fazem o uso de anticoncepcional, 50% (5/10) tiveram apenas dois parceiros sexuais ao longo da vida e nenhuma das mulheres (100%) apresentaram relatos em seu prontuário relacionado a presença de DSTs.

Tabela 4 – Perfil clínico das mulheres envolvidas no estudo proteômico (Parte 2).

Variáveis	F	f (%)
Hábito de fumar		
Não	10	100%
Sim	0	0%
Uso de anticoncepcional		
Não	5	50%
Sim	5	50%
Nº de parceiros sexuais		
Um	2	20%
Dois	5	50%
Três	0	0%
Quatro	1	10%
Cinco ou mais	2	20%
Presença de DST no prontuário		
Não	10	100%
Sim	0	0%

f: Frequência; f (%): Frequência Relativa

Um estudo realizado por Costa e colaboradores (2011), relacionado a prevenção do câncer de colo do útero no estado do Pará, destacando os fatores de risco tanto da lesão precursora quanto ao câncer cervical, obteve alguns dados similares aos descritos neste trabalho, na qual grande parte das participantes iniciaram precocemente a atividade sexual, sendo a maioria multíparas e não fumantes. Adicionalmente, este relata também que esses fatores comportamentais podem influenciar diretamente no desenvolvimento das lesões precursoras do colo do útero, sendo os de grande relevância: quantidade de parceiros ao longo da vida, iniciação sexual precoce, multiparidade, tabagismo e o uso de contraceptivos (COSTA et al., 2011).

2.4.2 Estudo proteômico

Foram selecionadas apenas dez pacientes para o estudo proteômico em virtude do alto custo e da demanda de tempo na máquina considerando os tipos de amostras. As amostras submetidas à análise de nLC-MS/MS demonstraram cromatogramas bem semelhantes mostrado no Gráfico 1 referente à pacientes com lesões de NIC 2 e NIC 3 bem como no gráfico 2, no qual representa as amostras de margens adjacentes de NIC 2 e NIC 3. De forma geral, houve uma proximidade na eluição das amostras, tendo diferenças principalmente na concentração de proteínas.

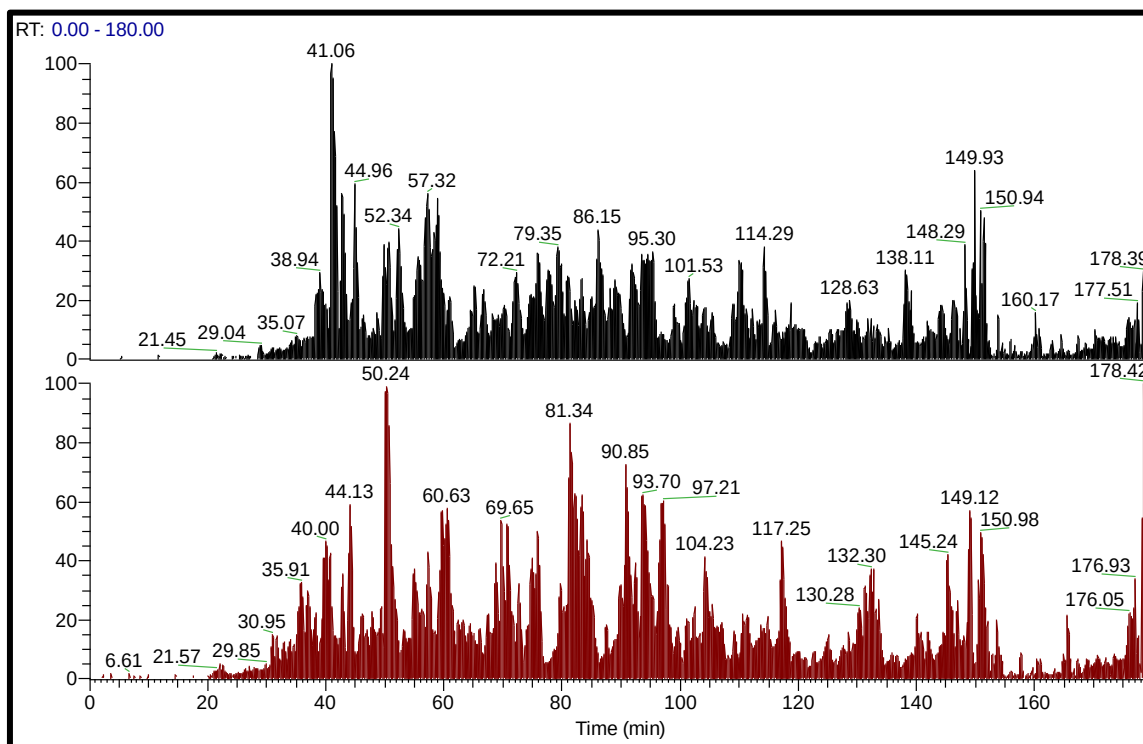


Gráfico 1 - Cromatogramas de uma réplica técnica de amostras do cerne da lesão de NIC 2 (preto) e NIC 3 (vermelho) durante uma análise de 180 minutos.

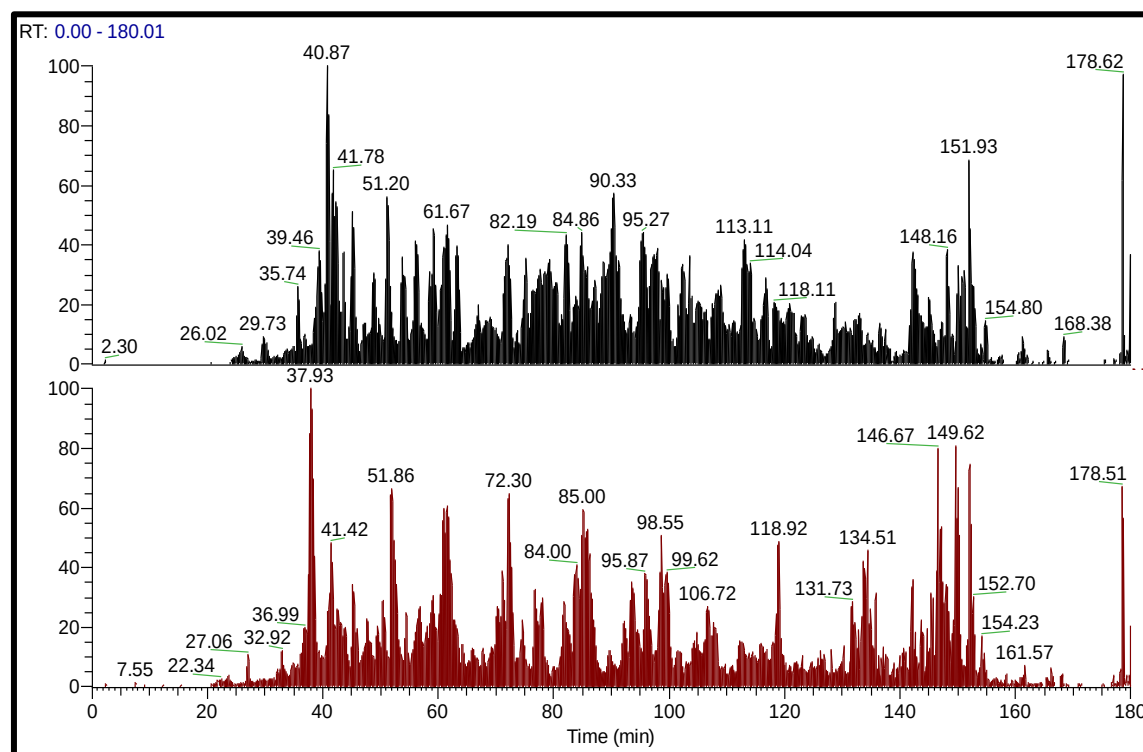


Gráfico 2 - Cromatogramas de uma réplica técnica de amostras da margem adjacente de NIC 2 (preto) e NIC 3 (vermelho) durante uma análise de 180 minutos.

2.4.3 Análise do gel unidimensional (1D)

As amostras das pacientes foram submetidas à eletroforese unidimensional (1D), com o intuito de averiguar o perfil proteico inicial. Através dessa análise, foi possível verificar bandas proteicas expressas de forma bem distribuída no decorrer do gel tanto em NIC 2 quanto em NIC 3 e suas respectivas margens adjacentes. Dentre as principais proteínas encontradas em todas as amostras, de acordo com o marcador molecular com padrões pré-corados utilizado (n°. catálogo 161-0317, Biorad®), tem-se: a miosina e a ovoalbumina (Figura 13).

As miosinas são uma das principais superfamílias de motores moleculares à base de actina, as quais se movimentam ao longo do microfilamento na presença de ATP (BLOEMINK; GEEVES, 2011; LI; YANG, 2016). Estas atuam em diversos processos celulares, sendo implicadas no desenvolvimento de várias doenças humanas como por exemplo, distúrbios neurológicos e o câncer (BOND et al., 2012). Nos resultados obtidos da análise por *shotgun proteomics*, foram identificados algumas isoformas de miosina presentes na maioria das amostras analisadas como: a cadeia leve de miosina 6B (exceto nas amostras 9 e amostra 6), cadeia de tropomiosina alfa-4 (exceto nas amostras 9 e 14) e alfa-3 (exceto na amostra 9). Todas essas isoformas de miosina já foram descritas como potencial biomarcador de cânceres, como o de bexiga (HUMAYUN-ZAKARIA et al., 2019) e o de próstata (WEBBER et al., 2016).

A ovoalbumina é uma proteína de função desconhecida pertencente à família das serpinas (HUNTINGTON; STEIN, 2001). Essa proteína ficou conhecida como um subconjunto da superfamília serpina, definida como ‘Ov-serpinas’ (ASKEW et al., 2001). Na análise realizada por *shotgun proteomics*, foram identificadas algumas isoformas de ‘Ov-serpinas’ presentes em grande parte das amostras como a serpina B3, que se tem relatos da sua baixa expressão em casos de câncer cervical (CHOKCHAICHAMNANKIT et al., 2019); a serpina B4, a qual está envolvida na incidência e progressão do câncer de mama (MAJIDZADEH-A; GHARECHAH, 2013); a serpina B5, sendo expressa diferencialmente em diversos tipos de cânceres, incluindo o câncer gástrico (ZHENG; GONG, 2017), de ovário (BARNABAS et al., 2019) e o câncer cervical (SHIH et al., 2019); e a serpina B13, a qual se tem relatos dessa proteína expressa em pacientes com lesões precursoras do câncer cervical quando comparadas a pacientes saudáveis (VAN RAEMDONCK et al., 2014).

Analisando a Figura 12, pode-se observar que algumas amostras possuem bandas diferenciais, quando se compara NIC 2 e NIC 3. Como por exemplo, as amostras 17 e 18 de NIC 2 possui bandas referentes a albumina sérica bovina, porém esta não se encontra presente em NIC 3. A albumina sérica bovina (BSA) tem sido utilizada em estudos biomiméticos, ou seja, estudos voltados a compreensão das estruturas biológicas e suas funções, devido a sua semelhança estrutural com a albumina humana (HSA) (MOREIRA et al., 2014). Contudo, ao realizar a análise por *shotgun proteomics* foi possível identificar a presença da albumina sérica em quase todas as amostras estudadas (incluindo margem e lesão), com exceção de uma amostra de lesão (amostra 9). Sabe-se que a albumina atua em uma ampla variedade referente as funções biológicas, sendo que atualmente existem relatos dessa proteína tanto como transportadora terapêutica contra o câncer (HOOGENBOEZEM; DUVALL, 2018) bem como um indicador de prognóstico independente para o câncer cervical operável (ZHENG et al., 2016). Com relação as lesões de alto grau do CCU, um estudo mostrou que os níveis séricos de albumina presente em HSIL com HPV são mais baixos quando comparados a pacientes saudáveis, o que corroborou para investigação da persistência do HPV nessas lesões (ABIKE et al., 2011).

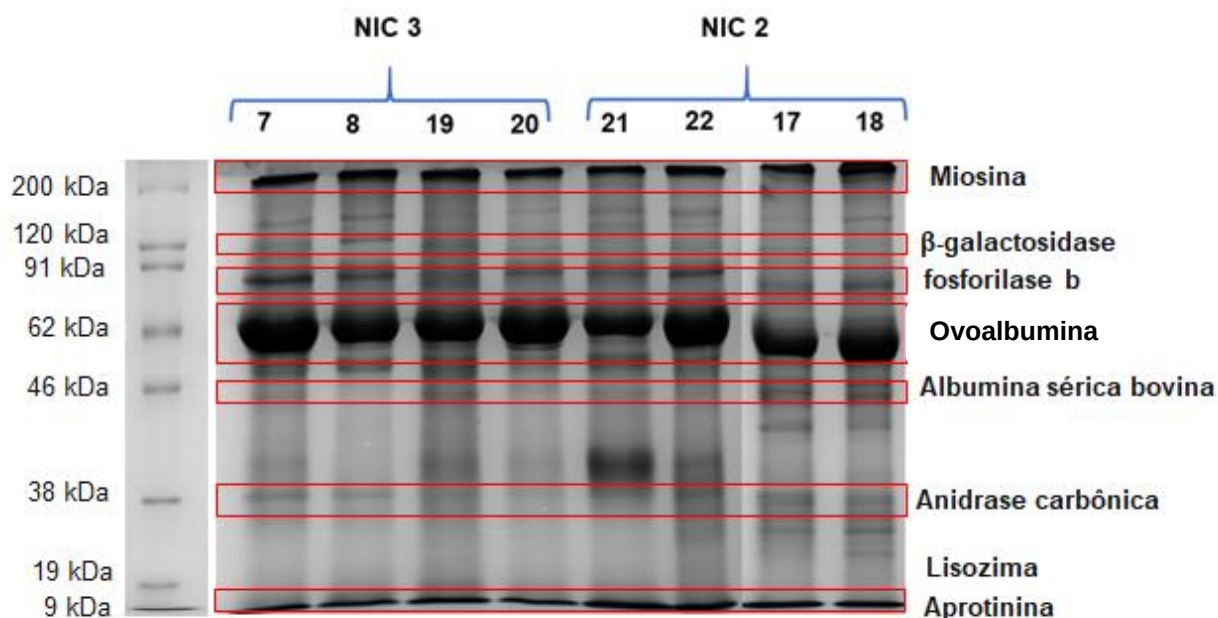


Figura 12 – Eletroforese unidimensional das amostras selecionadas para o estudo proteômico. Legenda: Amostras 7 e 19 – lesão NIC 3; Amostras 8 e 20 – margens NIC 3. Amostras 21 e 17 – lesão NIC 2; Amostras 22 e 18 – margens NIC 2.

A Figura 13 mostra o resultado da eletroforese unidimensional referente as amostras de NIC 2 e suas respectivas margens adjacentes, na qual nota-se que todas

as amostras referentes ao cerne da lesão de NIC 2 possuem o perfil de proteínas bastante semelhantes, sendo que o mesmo ocorre para as suas margens adjacentes. Vale ressaltar que devido a problemas com a quantidade de amostra presente na caneleta 12, essa amostra apresentou uma expressão proteica diminuída.

Apesar dessas semelhanças, notou-se que algumas amostras apresentaram maiores concentrações de determinadas proteínas, como as amostras 3, 4, 13 e 14, onde estas apresentaram uma banda em torno de 38 kDa. De acordo com o marcador molecular padrão utilizado, esta banda refere-se a anidrase carbônica. As anidrases carbônicas são enzimas conhecidas há décadas que catalisam a conversão reversível de dióxido de carbono em bicarbonato (SUPURAN, 2018). Uma variedade de isoformas de anidrases carbônicas possuem envolvimento com diferentes doenças, como o câncer (SINGH et al., 2018). Apesar do gel unidimensional não mostrar claramente a sua presença nas amostras, na análise por *shotgun proteomics* foi possível identificar a presença da anidrase carbônica 1 – potencial biomarcador para a detecção precoce do câncer, incluindo o câncer de pulmão (WANG et al., 2016); e da anidrase carbônica 2 em todas as amostras de lesão e margem de NIC 2.

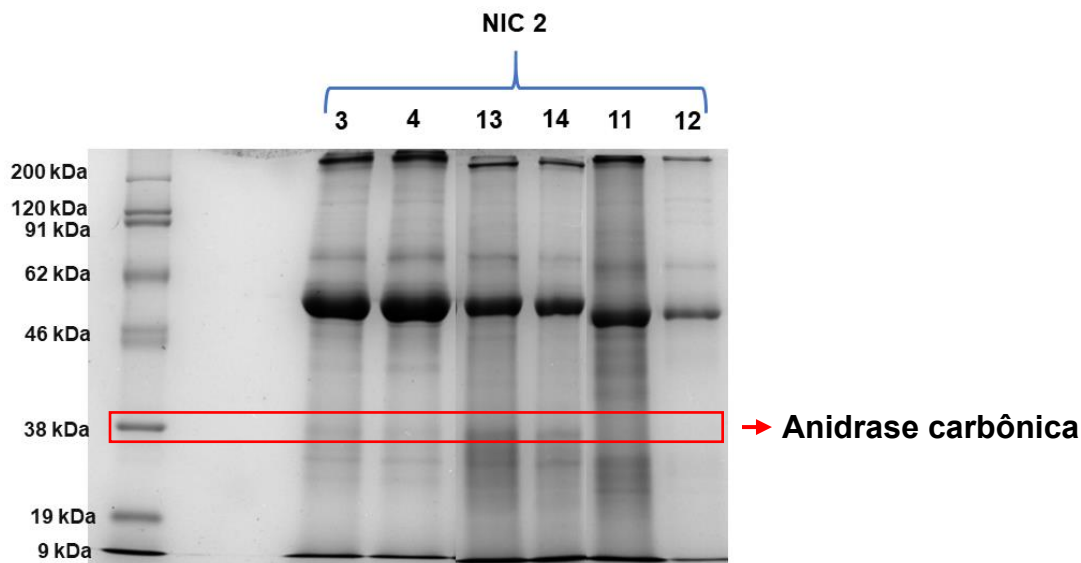


Figura 13 – Eletroforese unidimensional das amostras selecionadas de NIC 2 para o estudo proteômico. Legenda: Amostras 3, 13 e 11 – lesão NIC 2; Amostras 4, 14 e 12 – margem NIC 2.

Com relação as amostras do cerne da lesão de NIC 3 e sua respectiva margem adjacente (Figura 14), foi possível observar também que o perfil de proteínas presentes na maioria das amostras apresentou similaridade. Contudo, o perfil proteico da amostra 5 não obteve banda da região de 38 kDa (anidrase carbônica). Na análise por *shotgun proteomics*, foi possível verificar a presença de isoformas dessa proteína incluindo a

anidrase carbônica 1 e a anidrase carbônica 2 na amostra 5; sendo que a falta de bandas no gel unidimensional pode ser uma limitação da técnica.

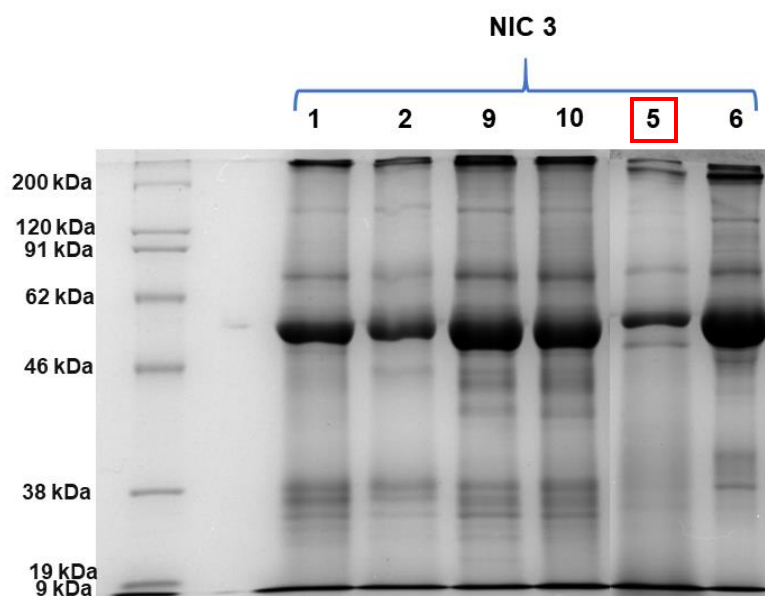


Figura 14 - Eletroforese unidimensional das amostras selecionadas de NIC 3 para o estudo proteômico. Legenda: Amostras 1, 9 e 5 – lesão de NIC 3; Amostras 2, 10 e 6 – margens de NIC 3.

2.4.4 Identificação proteica

A identificação das proteínas presentes nas lesões precursoras e suas respectivas margens adjacentes foi realizada utilizando o *software PatternLab for Proteomics* (CARVALHO et al., 2016). No total, foram identificadas 1.776 proteínas com redundância e 1.318 proteínas únicas para lesão NIC 2. Para a margem adjacente NIC 2 foram identificadas 1.136 proteínas com redundância e 784 proteínas únicas nessa condição. Com relação a lesão de NIC 3, foram identificadas 1.564 proteínas com redundância e 1.100 proteínas únicas. Na margem adjacente NIC 3 foram identificadas 944 proteínas com redundância e 656 proteínas únicas nessa condição. A lista completa das proteínas identificadas está disponível no Suplemento 1 [clique aqui]. Em suma, as proteínas encontradas apresentam funções destinadas a processos biológicos, função molecular e componentes celulares.

De modo geral, a composição das proteínas encontradas tanto nas lesões de NIC 2 e NIC 3 quanto nas suas respectivas margens adjacentes apresentaram características em comum (Gráficos 3 e 4). A maioria foi composta por proteínas relacionadas ao componente celular (GO 0005575), com 33,9% para as lesões de NIC 2/NIC 3 e 34,1% para suas respectivas margens adjacentes, conforme mostrado no

Gráfico 3 e 4, respectivamente. Dentre essas proteínas, foram identificadas principalmente as pertencentes à parte celular, que é a unidade estrutural e funcional básica de todos os organismos (GO 0044464) representando 20,9% para lesões de NIC 2/ NIC 3, como por exemplo a proteína D-3-fosfoglicerato desidrogenase e 26% para as margens adjacentes, destacando-se o transgelina-2.

A proteína D-3- fosfoglicerato desidrogenase, também conhecida como ERp57, é uma tiol oxidoreductase específica de glicoproteína. Esta proteína já foi correlacionada com a progressão do câncer de colo de útero (CHUNG et al., 2013), onde através de análise imuno-histoquímica demonstrou-se que a expressão proteica de ERp57 em NICs foi regulada negativamente quando comparadas a tecidos normais. Além disso, sua baixa expressão foi relacionada significativamente à uma pior sobrevida, e consequentemente, um resultado considerado ruim para pacientes diagnosticados com câncer cervical (CHUNG et al., 2013).

Já a transgelina-2 é uma importante proteína de ligação à actina. Quando desregulada, esta pode contribuir para a proliferação, invasão e metástase de células cancerígenas (YIN; ULLOA; YANG, 2019). Estudos já investigaram o papel dessa proteína no câncer de colo de útero utilizando células HeLa, na qual revelou-se que a superexpressão da transgelina-2 inibe a invasão e migração de células do câncer cervical, sendo um alvo para tratamento e prognóstico do CCU (ZHOU et al., 2019b).

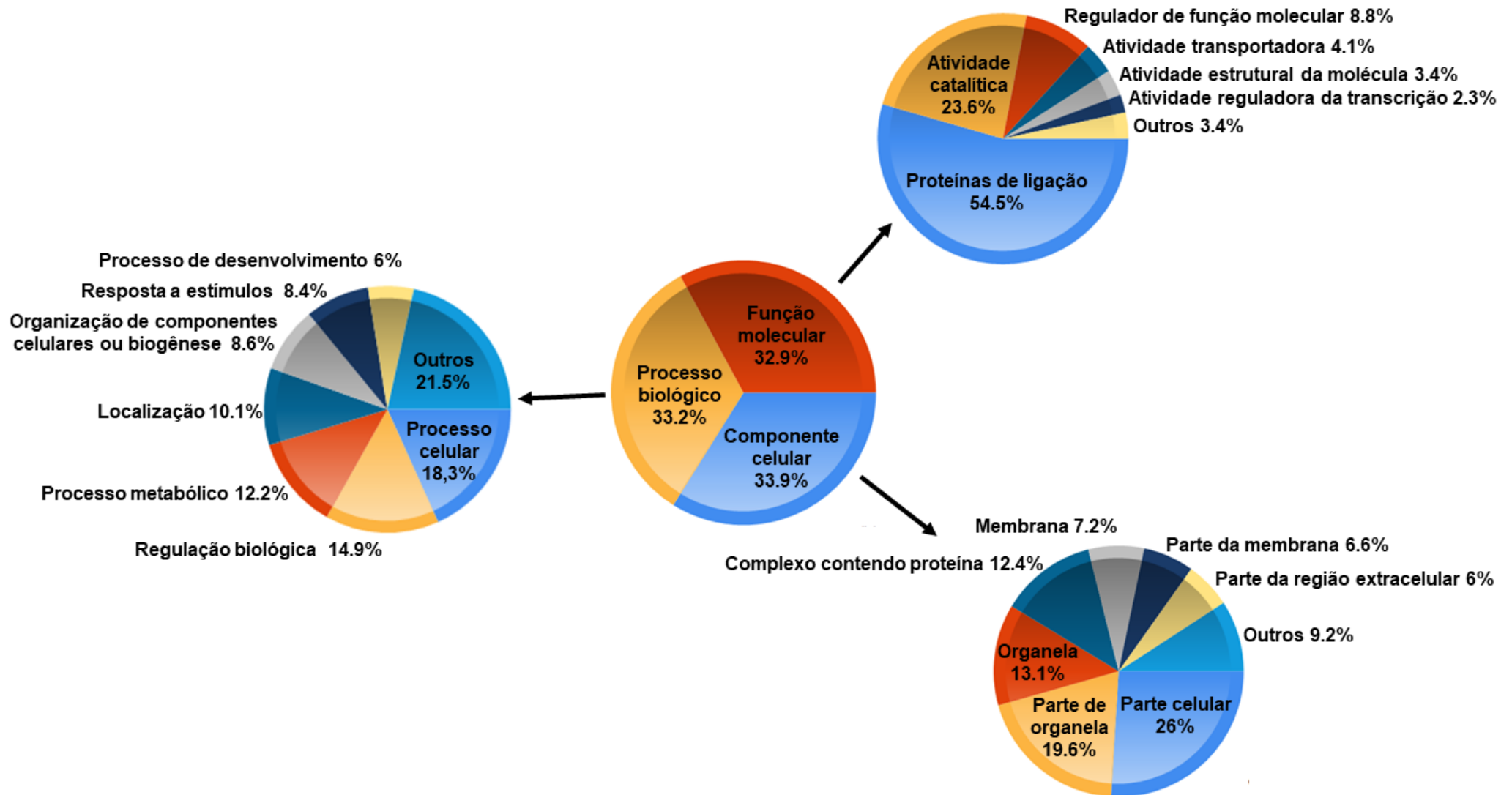


Gráfico 3 - Resultado da análise no *Gene Ontology* referente ao cerne das lesões de NIC 2 e NIC 3, mostrando as funções das proteínas identificadas em porcentagem nos tecidos analisados.

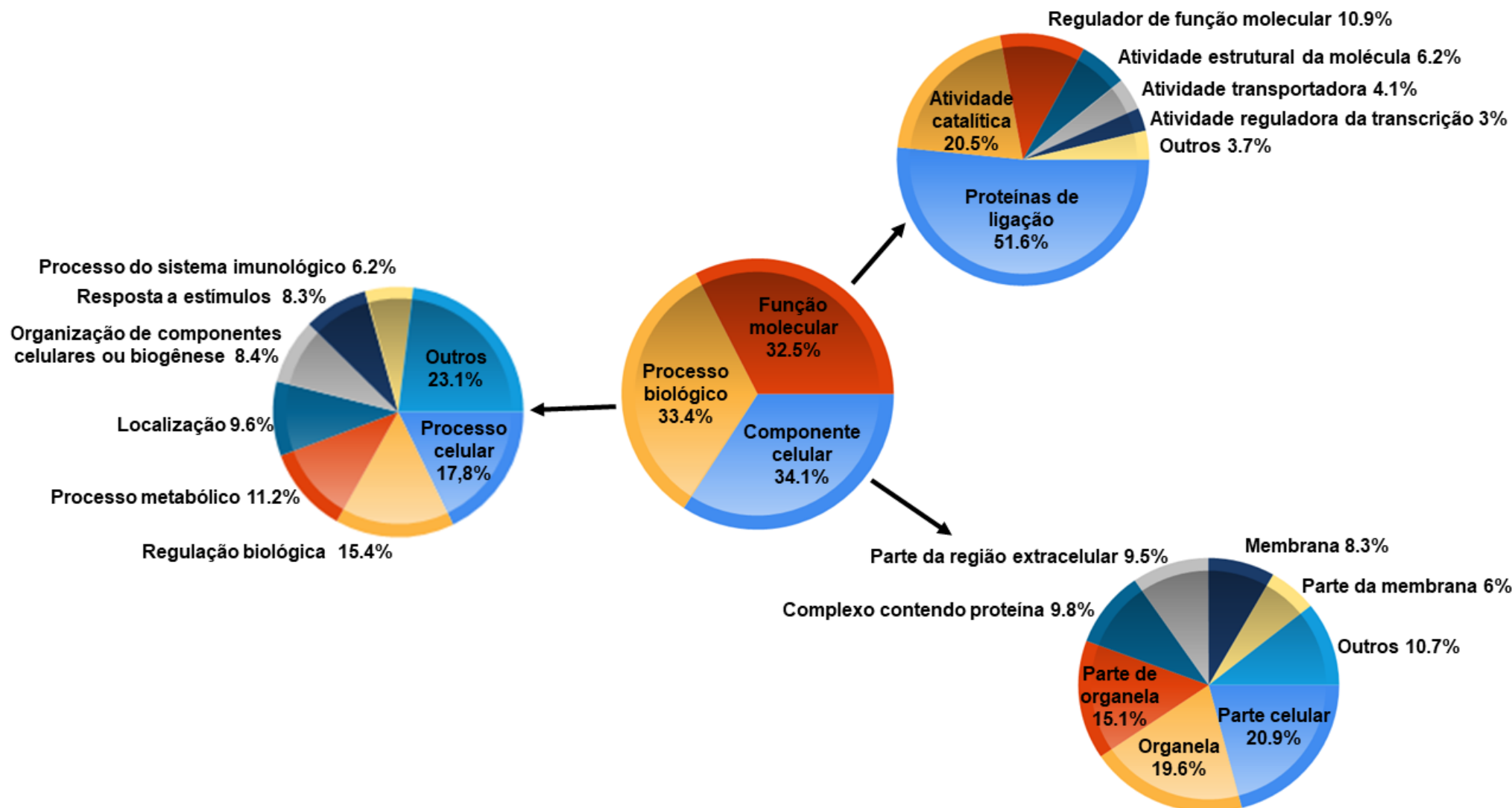


Gráfico 4 - Gráfico do resultado da análise no *Gene Ontology* referente as margens adjacentes de NIC 2 e NIC 3, mostrando as funções das proteínas identificadas em porcentagem nos tecidos analisados.

Foram identificadas também proteínas relacionadas a processos biológicos (GO 0008150), sendo um total de 33,2% para as lesões de NIC 2/NIC 3 e 33,4 % para as suas respectivas margens adjacentes, respectivamente (Gráfico 3 e 4). Dentre estas, proteínas como a filamina-A, grancalcina e lisozima C relacionadas aos processos celulares (GO 0009987), se destacaram com maior porcentagem em ambas as condições, sendo 18,3 % para as lesões NIC 2/NIC 3 e 17,8% para as margens adjacentes. Alguns exemplos relacionados às proteínas identificadas no processo celular já foram citados na literatura correlacionadas as NICs bem como ao CCU. Nas lesões de NIC 2/NIC 3, tem-se a serpina H1 e a galectina 1, e referentes às margens adjacentes tem-se a galectina 3.

A proteína serpina H1, conhecida também como proteína de choque térmico 47 (HSP47), possui papel fundamental na maturação molecular do colágeno sendo alvo promissor para tratamentos de doenças contendo distúrbios relacionados ao colágeno, como a fibrose no fígado (CAO et al., 2019; ITO; NAGATA, 2017). Já existem relatos na literatura que demonstraram a serpina H1 regulada positivamente em tecidos cancerígenos cervicais bem como na neoplasia intraepitelial cervical (YAMAMOTO et al., 2013).

Já as galectinas são proteínas que se ligam aos açúcares β -galactosídeos e que vêm sendo investigadas para biomarcadores e alvos terapêuticos para o câncer de colo de útero. A superexpressão de galectina 1 tem sido ainda correlacionada com o aumento da invasão tumoral e a baixa sobrevida de pacientes com câncer cervical (PUNT et al., 2015). Tais fatos relacionados a galectina 1 são condizentes com os dados obtidos no presente estudo, visto que a galectina 1 foi encontrada em amostras referente à lesão NIC2/NIC3, o que pode estar relacionado à proliferação dessas lesões. Contudo, a galectina-3 foi encontrada apenas expressa na margem adjacente de NIC2/NIC3 e já existem estudos que apontam a regulação positiva da galectina-3 presente nos tecidos com NICs de alto grau, que pode estar relacionada a progressão do tumor (MA et al., 2018).

Além das proteínas pertencentes a componentes celulares e a processos biológicos, foram identificadas também proteínas relacionadas à função molecular (GO 0003674), sendo 32,9% para lesões NIC 2/NIC 3, principalmente das proteínas de ligação (GO 0005488) (54,5%), como por exemplo a ezrina; e também da atividade catalítica (GO 0003824) (23,6%), como a ceruloplasmina (Gráfico 3).

A ezrina é uma proteína de ligação ao citoesqueleto da membrana, a qual possui

relatos da sua superexpressão em cânceres cervicais, indicando ser um biomarcador eficaz nesses casos (KONG et al., 2013, 2016). Já a ceruloplasmina é uma glicoproteína, sendo a principal transportadora de cobre no sangue (SENRA VARELA; LOPEZ SAEZ; QUINTELA SENRA, 1997). Apesar do aumento das concentrações séricas de cobre serem desconhecidas em pacientes com câncer, alguns estudos já relatam que a presença do câncer pode aumentar os níveis séricos de cobre durante anos antes de ser diagnosticado (COATES et al., 1989; SHAH; KALAL, 2019). Na literatura, há relatos da ceruloplasmina como potenciais biomarcadores preditivos para a progressão das NICs de alto grau (LOKAMANI et al., 2014).

Similarmente as proteínas encontradas nas lesões NIC 2/NIC 3 referentes à função molecular (GO 0003674), também foram identificadas com maior porcentagem para as margens adjacentes as proteínas de ligação (GO 0005488) (51,6%), como por exemplo a tetranectina; e também associada a atividade catalítica (GO 0003824) (20,5%), como a peroxiredoxina 6 (Gráfico 4).

A proteína tetranectina é uma proteína de ligação com o plasminogênio da lectina do tipo C. Sua ligação causa o melhoramento da ativação do plasminogênio e, consequentemente, há aumento da fibrinólise que degrada o estroma facilitando a invasão de células tumorais (HOLTET et al., 1997; LOOI et al., 2009); já existem indícios que a tetranectina está envolvida na progressão do câncer cervical (LOOI et al., 2009). Já a peroxiredoxina 6 é uma proteína que atua na defesa antioxidante do organismo, como no reparo das membranas celulares danificadas pela diminuição de fosfolipídios peroxidados (FUCHS-TARLOVSKY et al., 2013). Sua expressão contribui para o potencial celular tanto invasivo quanto metastático, sendo regulada positivamente no câncer cervical (LI; WU; ZHOU, 2014). Tais relatos são bastante interessantes visto que no presente estudo as proteínas tetranectina e peroxiredoxina 6 foram encontradas em amostras de margem adjacente de NIC 2/NIC 3, apresentando assim possíveis resquícios de processos moleculares encontrados nas lesões do CCU nesse tecido; o que poderia apontar para uma possível progressão da doença.

Logo, os dados aqui apresentados são importantes para a melhor compreensão dessas lesões bem como de suas margens adjacentes a nível de proteínas e suas respectivas funções no desenvolvimento dessas neoplasias.

2.4.5 Análise diferencial das NICs e suas respectivas margens adjacentes

- **Lesão NIC 2 x Lesão NIC 3**

As análises diferenciais realizadas apresentaram proteínas exclusivas e compartilhadas em ambas as condições. Ao comparar lesão de NIC 2 com lesão de NIC 3, identificou-se um total de 783 proteínas, sendo 546 proteínas compartilhadas entre si, 193 proteínas exclusivas para lesão de NIC 2 e 44 proteínas exclusivas para NIC 3, como mostrado no Gráfico 5.

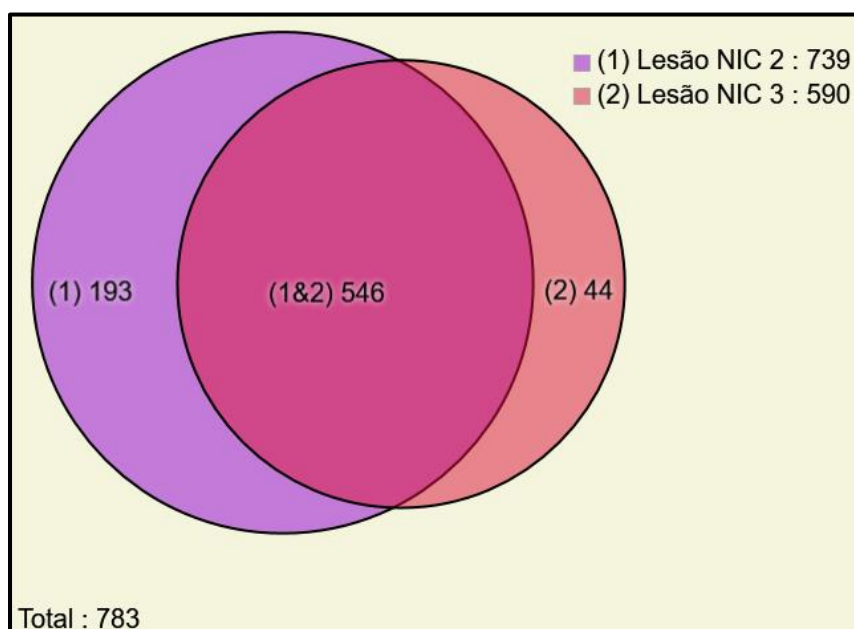


Gráfico 5 - Diagrama de Venn referente às proteínas expressas nas lesões de NIC 2 e NIC 3. Legenda: Proteínas expressas unicamente nas lesões de NIC 2 (roxo), proteínas expressas unicamente em NIC 3 (vermelho) e proteínas compartilhadas em ambas (rosa).

Dentre as proteínas unicamente expressas nas amostras de lesões com NIC 2, destacam-se:

❖ **Enzima conjugadora SUMO UBC9:** Esta proteína é membro da família de enzimas responsáveis por catalisar uma série de eventos para a conjugação de proteínas alvo com SUMO, cuja modificação/desconjugação se manifesta em processos biológicos de doenças como o câncer, sendo compostas por E1 (SAE1 / SAE2 ativadora de SUMO), E2 (Ubc9 conjugadora de SUMO) e E3 (ligante a SUMO) (HAY, 2005). Essa proteína foi identificada em três amostras de lesão NIC 2. Há relatos na literatura que mostram a regulação positiva da enzima conjugadora SUMO Ubc9 em lesões cervicais

e também como um possível biomarcador para infecção oncogênica do HPV, podendo ser utilizada para o monitoramento da progressão dessa infecção (MATTOSCIO et al., 2015).

❖ Proteína tumoral D52 (TPD52): Essa proteína vem sendo de particular relevância em diversos tipos de câncer (BYRNE et al., 2014). Já existem relatos da superexpressão dessa proteína em casos de câncer de colorretal (LI et al., 2017), de próstata (RUBIN et al., 2004) e de ovário (BYRNE et al., 2005, 2010). A proteína tumoral D52 foi encontrada em quatro amostras unicamente de lesão NIC 2. Contudo, seu mecanismo no câncer cervical e suas respectivas lesões ainda não é compreendido. Porém, já existem relatos que a sua inibição colabora para a radiosensibilidade do câncer do colo do útero (WU et al., 2018).

❖ Queratina 17 do citoesqueleto, tipo I (KRT17): Essa é uma proteína citoesquelética com múltiplas funções, a qual regula uma variedade de processos biológicos como o crescimento e a proliferação celular (YANG; ZHANG; WANG, 2019). Sua superexpressão já é relatada em diversas doenças, incluindo o carcinoma epidermóide oral (COELHO et al., 2015) e o gástrico (CHIVU-ECONOMESCU et al., 2017). Com relação as lesões precursoras do câncer de colo de útero, a KRT17 demonstrou uma superexpressão nas lesões precursoras de alto grau e no carcinoma espinocelular cervical (CEC) quando comparados à mucosa escamosa normal e às lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau, indicando um potencial a biomarcador para distinção de lesões cervicais malignas de lesões não malignas (ESCOBAR-HOYOS et al., 2014). Tal fato condiz com os resultados obtidos nesse estudo, pois essa proteína foi encontrada em lesão de NIC 2 considerada de alto grau. Além disso, estudos posteriores mostraram a KRT17 altamente expressa na maioria de casos com adenocarcinoma invasivo e adenocarcinoma *in situ* do CCU, apresentando também um potencial marcador para prognóstico negativo para a sobrevida do paciente (MOCKLER et al., 2017).

Adicionalmente, ao realizarmos uma análise da interação da KRT17 a partir do programa STRING (Figura 15), nota-se sua interação com diversas subunidades de queratina, incluindo queratina 1 do citoesqueleto, tipo II (KRT1) que também foi identificada em amostras de lesão NIC 2. Essa proteína apresenta expressão diferencial em alguns tipos de câncer, incluindo o câncer de colorretal (FAYAZFAR et al., 2019) e o de bexiga (LEI et al., 2013). No contexto do câncer cervical, existem relatos apenas a respeito do seu gene com baixa expressão quando comparado a amostras de pacientes

saudáveis (DAI et al., 2019). Até o momento, não há achados sobre a expressão dessa proteína em lesões de NIC 2 na literatura. Contudo, no presente estudo, a proteína KRT1 foi expressa em três amostras de tecido de pacientes com lesão de NIC 2.

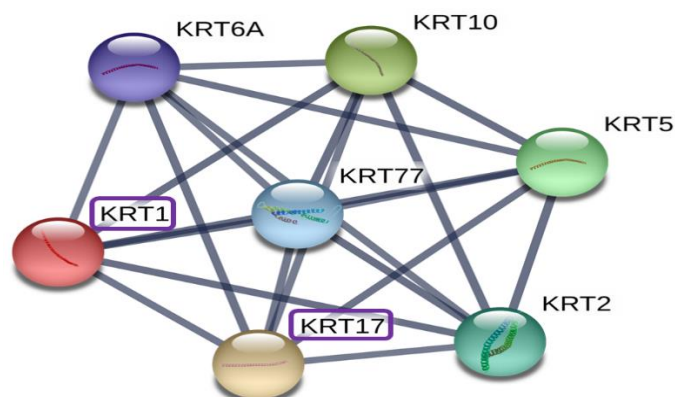


Figura 15 – Rede de interações da proteína KRT17 através do programa STRING 11.0. As linhas na cor cinza mostram confiança de evidência na interação, sendo que quanto mais intenso é a cor e a linha, mais alta é a confiança (score > 0,9). **Fonte:** <http://string-db.org/>.

Com relação as proteínas identificadas unicamente nas amostras com lesões de NIC 3, destacam-se:

❖ Proteína ribossômica ácida 60S P1 (RPLP1): Esta é membro das proteínas conhecidas como proteínas ribossômicas, as quais vêm sendo associadas à tumorigênese, tendo envolvimento na transformação celular e imortalização celular das células primárias (ARTERO-CASTRO et al., 2011). Existem relatos dessa proteína em alguns tipos de tumores ginecológicos, sendo altamente expressa no câncer endometrial e de ovário (ARTERO-CASTRO et al., 2011), além de ter uma associação para o prognóstico no câncer de mama triplo negativo (HE et al., 2018). No entanto, não foram achados relatos na literatura envolvendo essa proteína com o câncer cervical e suas respectivas lesões precursoras. No presente estudo, essa proteína foi encontrada em três amostras de pacientes com lesão de NIC 3. Além disso, ao analisar a rede de interações na Figura 16, nota-se que a proteína (RPLP1) interage com as proteínas ribossômica 60S L9 (RPL9) e L10 (RPL10). Essas proteínas também fazem parte da família ribossômica, sendo estas expressas diferencialmente no câncer de pulmão (DLAMINI; MPHAHLELE, 2006; MOLAVI; SAMADI; HOSSEINGHOLI, 2019). Especialmente com relação a proteína RPL10, existem relatos da sua alta expressão em câncer ginecológico, como o câncer de ovário podendo ser um alvo terapêutico (SHI et al., 2018). No atual trabalho, a proteína RPL9 foi expressa em três amostras de pacientes

com lesões de NIC 3 e a proteína RPL10 foi expressa em quatro amostras do mesmo grupo de pacientes. Tal fato é bem interessante, pois também não há achados sobre os mecanismos dessas proteínas em relação ao câncer cervical e suas lesões precursoras, sendo necessário uma maior investigação da presença dessas proteínas nessa neoplasia.

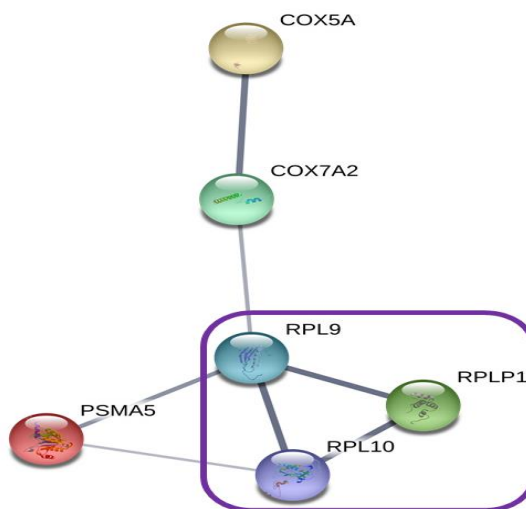


Figura 16 - Rede de interações da proteína RPLP1 através do programa STRING 11.0. As linhas na cor cinza mostram confiança de evidência na interação, sendo que quanto mais intenso é a cor e a linha, mais alta é a confiança (*score* > 0,9).

Fonte: <http://string-db.org>

❖ Proteína de ligação a IgGFc (FCGBP): Essa proteína foi encontrada em epitélios intestinais e do cólon, no colo do útero e nos fluidos secretados por essas células em humanos, sendo altamente expressa em tecidos de pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, que tinham a presença da infecção do HPV (WANG et al., 2017). Nesse estudo, essa proteína foi identificada unicamente em três amostras de NIC 3. Já existem relatos da presença dessa proteína altamente regulada em soro de pacientes com câncer de colo de útero tanto em estágio inicial quanto em estágio tardio, quando comparados à controles saudáveis (BOICHENKO et al., 2014).

❖ Deletada em tumor cerebral maligno 1 (DMBT1): Esta é uma glicoproteína de supressão tumoral, a qual sua ausência é apontada como um marcador de malignidade em muitos cânceres como: colorretal (PENG et al., 2016), próstata (DU et al., 2011), mama (BRAIDOTTI et al., 2004), cérebro (MOTOMURA et al., 2012) e pulmão (SRIVASTAVA; KHURANA; SUGADEV, 2012). Tem-se relatos na literatura apresentando o DMBT1 como um marcador precoce para o câncer cervical (IBARRA

SIERRA et al., 2012). Em adição, essa glicoproteína é promissora como um possível marcador de regressão da lesão cervical, sendo detectada apenas em algumas amostras de LSIL (VALERO et al., 2018); o que é interessante visto que essa proteína foi identificada unicamente em três amostras de pacientes com lesões de NIC 3 no presente estudo, e isso pode mostrar indícios de regressão da doença.

A Figura 17 mostra um diagrama de barras realizado no *Gene Ontology* para os processos biológicos com enfoque na proliferação celular de proteínas presentes nas lesões de NIC 2 e de NIC 3 identificadas.

Sabe-se que a proliferação celular é definida como a multiplicação de células que resulta na propagação de determinada população celular. A proliferação de células anormais é favorecida pela inativação de vias moduladas pela p53, que está presente na grande maioria dos tumores humanos, incluindo o câncer cervical (LÓPEZ-SÁEZ et al., 1998; PAMPALONA et al., 2012; ROSA et al., 2009a).

A partir do diagrama (Figura 17), foi possível identificar proteínas envolvidas na proliferação de diferentes tipos de células, destacando-se o inibidor da elastase de leucócitos, a caderina-13 e a apolipoproteína A-I envolvidas na proliferação celular epitelial em ambas as lesões. Adicionalmente, observa-se que há proteínas identificadas unicamente em lesão de NIC 2, como as associadas a proliferação de células mesenquimais. Um exemplo é a proteína catenina beta-1, que já foi descrita como um fator de prognóstico ruim para a câncer cervical (LIANG et al., 2016).

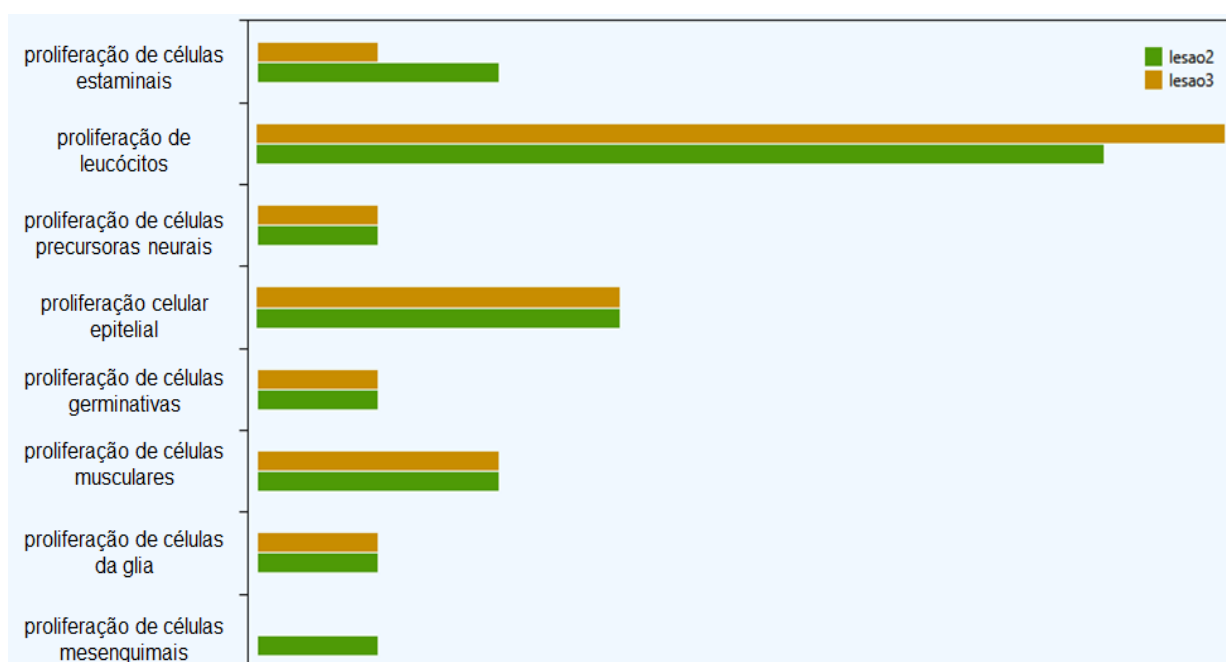


Figura 17 – Diagrama da distribuição diferencial de proteínas abundantes nas lesões de NIC 2 (lesão2) e NIC 3 (lesão3) associadas a proliferação celular.

E ainda, também foi possível observar algumas proteínas diferencialmente abundantes tanto nas lesões de NIC 2 quanto nas lesões de NIC 3 (Tabela 5). Dentre as proteínas mais abundantes nas lesões de NIC 2, destaca-se a cortactina e o antígeno CD44. Já para as lesões de NIC 3, tem-se a lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL)/lipocalina 2 (LCN2) e a mucina-5B.

Tabela 5 - Lista de algumas das proteínas diferencialmente abundantes quando comparados lesões de NIC 2 e lesões de NIC 3*.

ID	SEqCount	SpectCount	LogFOLD	Descrição
P80188	8	81	-0.999	Lipocalina associada a gelatinase neutrófila
P14866	5	14	-0.456	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea L
P48444	4	12	-0.857	Delta da subunidade coatômica
P16070	4	19	0.478	Antígeno CD44
P18827	2	15	0.448	Sidecano-1
Q9HC84	46	161	-1.340	Mucina-5B
Q14247	9	30	0.866	Cortactina
P12532	6	43	0.833	Creatina quinase tipo U, mitocondrial

*Nas colunas tem-se: o ID do UniProt, a contagem da sequência peptídeo (SeqCount), a contagem espectral (SpecCount), a variação da média de logFold dos peptídeos referentes a proteína descrita. Os valores de logFold positivo representam proteínas abundantes na lesão NIC 2, já os valores negativos representam proteínas abundantes na lesão NIC 3.

A cortactina (substrato das quinases sarcomas – Src) é uma proteína de ligação à actina, a qual está implicada na regulação do citoesqueleto sendo constantemente superexpressa em células cancerígenas, como em câncer de ovário (LI et al., 2016; YIN; MA; AN, 2017). Trabalhos relatam que a cortactina pode aumentar a migração celular, disseminação e a metástase de células tumorais (CHUMA et al., 2004; YIN; MA; AN, 2017).

O antígeno CD44 é uma das proteínas de membrana que já foi relatada na tumorigênese, podendo estar envolvida tanto no crescimento quanto na invasão do tumor (PAULIS et al., 2015). Estudos observaram que a proteína CD44 possui um aumento significativo em casos de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e carcinoma microinvasivo (MIC) (DASARI; WUDAYAGIRI; VALLURU, 2015). Além disso, observou-se que à medida que as lesões aumentavam de NIC 1 para NIC 3 e por conseguinte para MIC, o CD44 foi diminuindo progressivamente (DASARI; WUDAYAGIRI; VALLURU, 2015). Tal fato condiz com o resultado do nosso estudo, pois essa proteína

possui mais abundância em NIC 2 do que em NIC 3. Além de que, existem estudos que apontam a proteína CD44 como marcador de distinção entre o carcinoma maligno cervical dos casos pré-malignos (DASARI; RAJENDRA; VALLURU, 2014).

A lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL)/lipocalina 2 (LCN2) é uma proteína pertencente ao grupo das lipocalinas. Estas apresentam uma ampla diversidade tanto estrutural quanto funcional, e já foram envolvidas na proliferação celular em câncer humano (CANDIDO et al., 2014). Nesse sentido, um membro predominante dessa família é justamente a NGAL/LCN2 (CANDIDO et al., 2014; SYRJÄNEN et al., 2010). Esta proteína já foi expressa em alguns tipos de células em resposta a diversas lesões, principalmente em doenças renais (BOLIGNANO et al., 2008). A expressão de NGAL/LCN2 também foi investigada em associação com as infecções por HPV bem como relacionada a evolução dos graus presentes nas NICs (SYRJÄNEN et al., 2010). Como resultado, foi possível observar que a sua regulação positiva estava associada com a detecção do HPV de alto risco e também houve o aumento da expressão da NGAL/LCN2 de acordo com o aumento do grau das NICs (SYRJÄNEN et al., 2010). Este dado é bastante interessante, visto que no presente estudo essa proteína também apresentou um aumento na sua expressão de acordo com o grau da lesão, sendo mais expressa em NIC 3 quando comparada a NIC 2.

A mucina – 5B é uma proteína pertencente à família das mucinas, as quais executam uma variedade de funções fisiológicas. Em particular, essa proteína é uma das principais mucinas relacionadas às vias aéreas humanas (BUISINE et al., 1999). Contudo, a mucina – 5B também foi detectada na endocérvice uterina (AUDIE et al., 1995). Na literatura, há relatos de alterações na expressão dessa proteína para o prognóstico de câncer cervical (RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 2008).

- **Margem adjacente de NIC 2 x Margem adjacente de NIC 3**

Com relação as margens adjacentes, foram identificadas um total de 413 proteínas, sendo 281 proteínas compartilhadas entre si, 117 proteínas abundantes exclusivamente em margem de NIC 2 e 15 proteínas exclusivas em margem de NIC 3, como mostrado no gráfico 6.

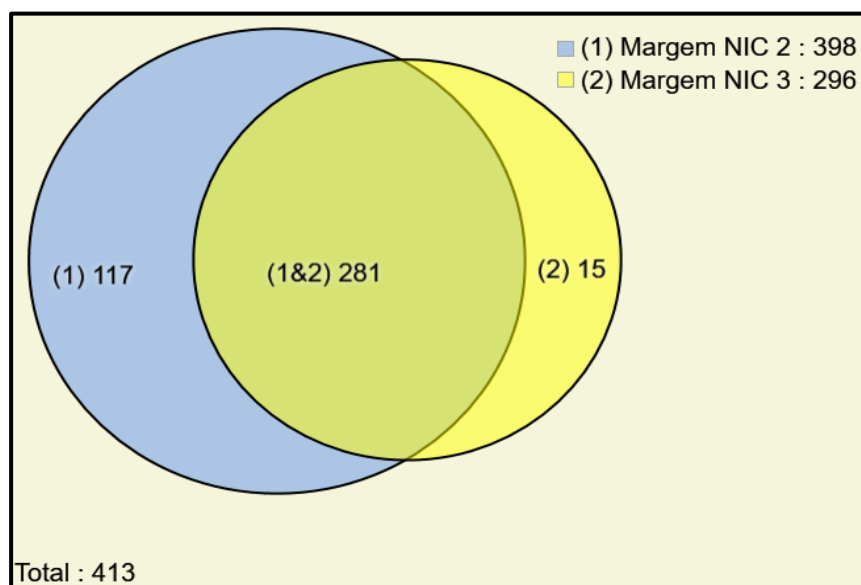


Gráfico 6 - Diagrama de Venn referente às proteínas expressas nas margens adjacentes de NIC 2 e NIC 3. Legenda: Proteínas exclusivamente abundantes nas margens de NIC 2 (azul), exclusivas em margens de NIC 3 (amarelo) e compartilhadas em ambas as condições (azul-amarelo).

Dentre as proteínas unicamente expressas nas amostras referentes as margens adjacentes de NIC 2, chamam a atenção:

❖ Proteína de captação de macrófagos (CAPG): Esta é uma proteína de ligação à actina presente na superfamília da gelsolina (LANG et al., 2019). A proteína CAPG possui um papel essencial perante as células normais, sendo que sua desregulação pode resultar em alterações malignas celulares (KIMURA et al., 2013; ZHAOJIE et al., 2019). Existem evidências da superexpressão dessa proteína em diversos tipos de câncer, incluindo o de pâncreas (THOMPSON et al., 2007), gástrico (ICHIKAWA et al., 2013), de próstata (MU et al., 2017) e de ovário (PARTHEEN et al., 2008). Além disso, a superexpressão da proteína CAPG também foi encontrada em pacientes com lesões precursoras do câncer de colo de útero quando comparadas a pacientes saudáveis (OSTADE; DOM; RAEMDONCK, 2014; VAN OSTADE et al., 2018). No presente estudo, essa proteína foi encontrada em quatro amostras de margem adjacentes a lesão de NIC 2, o que pode representar indícios de persistência da lesão; porém, são necessários estudos complementares para a confirmação de tal hipótese.

❖ Colágeno de cadeia alfa-1 (COL6A1) e alfa-3 (VI) (COL6A3): o COL6A1 e o COL6A3 pertencem à família dos colágenos especificamente relacionados ao colágeno tipo VI, uma proteína da matriz extracelular abundantemente distribuída; sendo

altamente expressa em diversos tipos de câncer e atuando no crescimento e progressão do tumor (CHEN; CESCONE; BONALDO, 2013). Dados da literatura relatam a regulação positiva do colágeno de cadeia alfa-1 e alfa-3 presentes no câncer, como por exemplo, no carcinoma hepatocelular (HANASH; SCHLIEKELMAN, 2014; LAI et al., 2011). Especialmente sobre o colágeno de cadeia alfa-1, existem relatos sobre seu potencial na proliferação de células cancerígenas bem como evitando a apoptose, tendo a regulação positiva no câncer de próstata resistente à castração e no crescimento das células do câncer de próstata *in vivo* (ZHU et al., 2015). Além disso, a expressão da proteína colágeno de cadeia alfa-1 mostrou-se regulada positivamente em tecidos com câncer cervical quando comparados a tecidos não tumorais, sendo sua alta expressão correlacionada significativamente com os estágios da doença (HOU et al., 2016). Ao realizar a análise de interação da proteína COL6A1 (Figura 18), foi possível observar sua interação com a proteína PCOLCE (descrita abaixo) e principalmente com a proteína COL6A3. No presente trabalho, a expressão da proteína COL6A1 foi encontrada em quatro amostras de tecidos de margens adjacentes à lesão NIC 2 e a expressão da proteína COL6A3 foi encontrada em cinco amostras, respectivamente. Esse fato demonstra possíveis indícios de persistência da lesão, o que pode colaborar para a predição da lesão NIC 2, bem como já tem relatos na literatura sobre sua predição associado a um mau prognóstico em pacientes com câncer cervical (HOU et al., 2016).

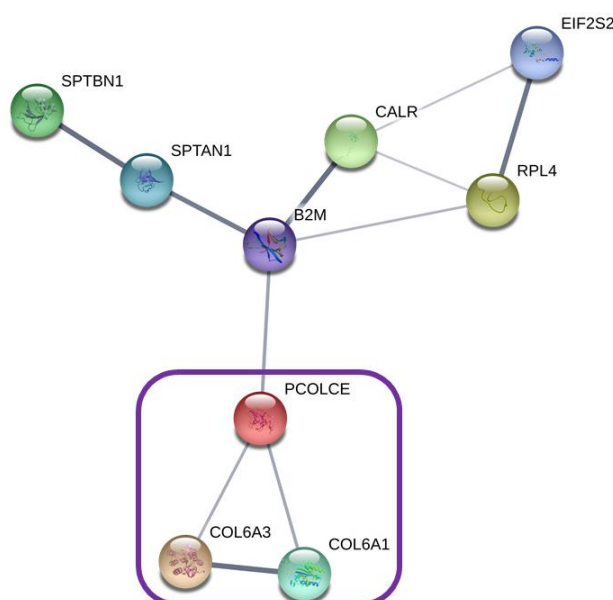


Figura 18 – Rede de interações da proteína colágeno de cadeia alfa-1 (COL6A1) através do programa STRING 11.0. As linhas na cor cinza mostram confiança de evidência na interação, sendo que quanto mais intenso é a cor e a linha, mais alta é a confiança (score > 0,9). **Fonte:** <http://string-db.org/>.

❖ Proteína potenciadora de procolágeno C-endorpeptidase 1 (PCOLCE): Essa é uma glicoproteína secretada que eleva a atividade do procolágeno C-proteinase para colaborar com a reconstrução da matriz celular (VADON-LE GOFF et al., 2011). Há relatos relacionados a desregulação da PCOLCE em várias doenças como por exemplo, na fibrose muscular e hepática (HASSOUN et al., 2016) e distrofia muscular oculofaríngea (RAZ et al., 2013). Sua presença no câncer cervical bem como em suas lesões precursoras ainda precisa ser explorada. Nesse estudo, a expressão da PCOLCE foi encontrada em quatro amostras tecidos de margens adjacentes à lesão NIC 2. Já existem relatos na literatura da superexpressão da PCOLCE (Figura 18) em tecidos do osteossarcoma e de seus substratos de procolágeno (como COL1A1 e COL6A3) relacionado à metástase (WANG et al., 2019).

Com relação as proteínas exclusivas nas amostras das margens adjacentes de NIC 3, destacaram-se:

❖ Globulina de ligação à tiroxina (SERPINA7): Esta é membro da família das serpinas e devido tais proteínas serem conformacionalmente instáveis, diversas mutações relacionadas à doença podem ocorrer (LAW et al., 2006). A SERPINA7 possui uma ligação não inibidora à tiroxina, sendo que a sua deficiência pode ocasionar o hipotireoidismo (LAW et al., 2006; REFETOFF et al., 1996). Essa proteína foi encontrada unicamente expressa em duas amostras de margem de NIC 3. Tal fato é interessante pois no câncer cervical, essa proteína já foi encontrada superexpressa na urina de pacientes com CCU quando comparados a pacientes saudáveis (CHOKCHAICHAMNANKIT et al., 2019).

❖ Proteína ribossômica 60S L3 (RPL3) e L31 (RPL31): A RPL3 e RPL31 são membros da família de proteínas ribossômicas que possuem papel essencial na biogênese do ribossomo bem como na tradução de proteínas, sendo alvo no desenvolvimento de estratégias para a melhoria de terapias em cânceres humanos (MOLAVI; SAMADI; HOSSEINGHOLI, 2019). Já se têm relatos na literatura sobre a proteína RPL31 associada à modulação do crescimento de células cancerígenas no câncer de próstata (MARUYAMA et al., 2014). Em relação a proteína ribossômica L3, dados relatam seu papel na apoptose de células do câncer de pulmão, inibindo a migração e invasão celular (RUSSO et al., 2016). Ao realizar a análise de interação dessas proteínas (Figura 19), observa-se que a RPL3 e a RPL31 interagem entre si, bem como com outras proteínas ribossômicas. Vale ressaltar que apenas a proteína RPL3 e a RPL31 foram encontradas em duas amostras de margens adjacentes a lesão NIC 3.

Não há achados na literatura sobre essas proteínas presentes no câncer cervical e suas respectivas lesões precursoras. Portanto, sugere-se que essas proteínas podem tanto agir colaborando para o crescimento da lesão como também pode inibir essa ação; necessitando de maiores investigações.

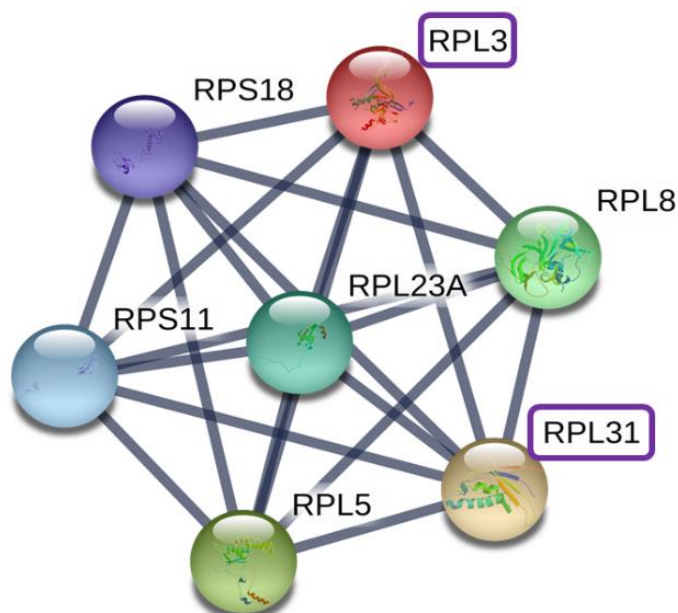


Figura 19 – Rede de interações da proteína ribossômica 60S L3 (RPL3) e L31 (RPL31) através do programa STRING 11.0. As linhas na cor cinza mostram confiança de evidência na interação, sendo que quanto mais intenso é a cor e a linha, mais alta é a confiança (score > 0,9). **Fonte:** <http://string-db.org/>.

A Figura 20 mostra um diagrama de barras realizado no *Gene Ontology* para os processos biológicos com enfoque na regulação biológica de proteínas presentes nas margens de NIC 2 e de NIC 3 identificadas. Nesta, foi possível verificar uma série de isoformas das histonas, incluindo a H1 e H4 presente em ambas as margens adjacentes. Especialmente com relação à histona H4, há relatos que essa proteína acetilada corrobora no processo de proliferação e sobrevivência celular da proteína E6 do papilomavírus humano, sendo este HPV de alto ou baixo risco (JHA et al., 2010).

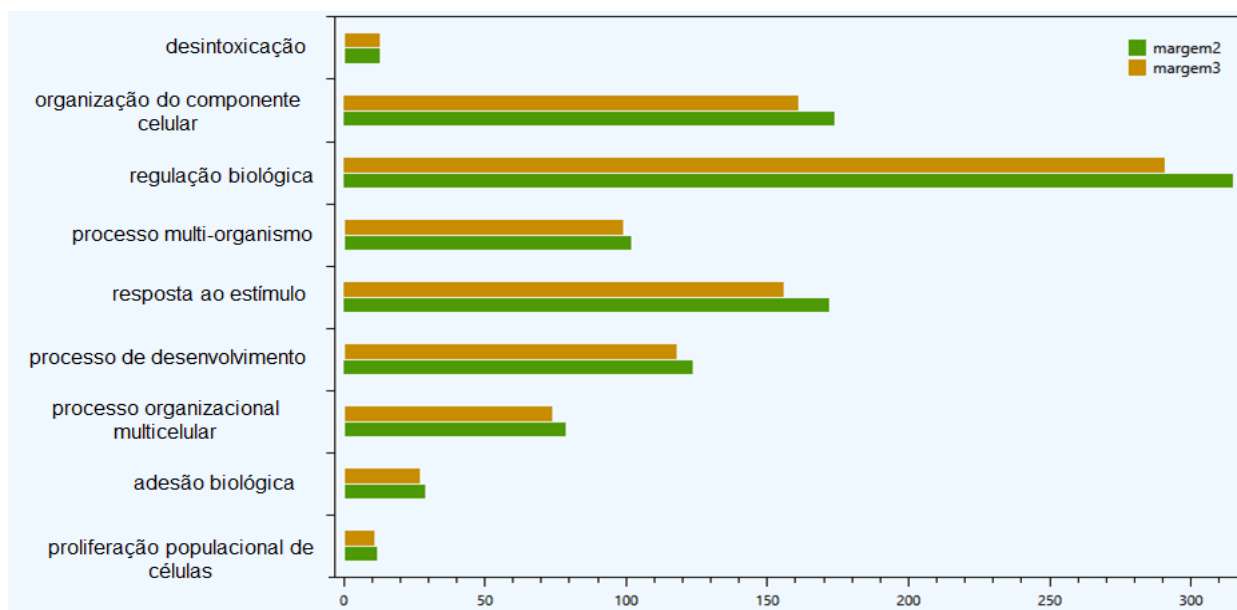


Figura 20 – Diagrama de distribuição diferencial de proteínas abundantes nas margens adjacentes de NIC 2 (margem2) e NIC 3 (margem3) associadas a processos de regulação biológica.

Além das proteínas expressas nas lesões, foi possível verificar as proteínas mais abundantes nas margens adjacentes de NIC 2 e NIC 3 (Tabela 6). Assim, na margem adjacente de NIC 2 destacaram-se o substrato c-quinase rico em alanina miristoilada (MARCKS) e a calnexina. Já em NIC 3, algumas das proteínas em abundância foram a cofilina-1 e a proteína de ligação ao retinol 4 (RBP4).

Tabela 6 - Lista de algumas das proteínas diferencialmente abundantes quando comparados margem adjacente de NIC 2 com de NIC 3*.

ID	SeqCount	SpectCount	LogFOLD	Descrição
P30048	4	23	0.374	Peróxido redutase dependente de tioredoxina
P07900	11	67	-0.217	Proteína de choque térmico HSP 90-alfa
P02753	2	21	-0.472	Proteína de ligação ao retinol 4
O60506	3	12	-0.326	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea Q
P27824	4	31	0.419	Calnexina
P06312	2	14	-0.600	Variável kappa de imunoglobulina 4-1
P55072	13	27	1.361	Retículo endoplasmático de transição ATPase
P52907	5	22	1.451	Subunidade proteica alfa-1 da proteína F-capping
P23528	9	44	-0.551	Cofilina-1
P29966	8	60	0.400	Substrato C-quinase rico em alanina miristoilada

*Nas colunas tem-se: o ID do UniProt, a contagem da sequência peptídeo (SeqCount), a contagem espectral (SpecCount), a variação da média de logFold dos peptídeos referentes a proteína descrita. Os valores de logFold positivo representam proteínas abundantes na margem NIC 2, já os valores negativos representam proteínas abundantes na margem NIC 3.

O substrato c-quinase rico em alanina miristoilado (MARCKS) é uma proteína relacionada à membrana, identificada como o predominante alvo da proteína quinase C (PKC) (BLACKSHEAR, 1993). Dentre seus papéis fundamentais, tem-se o controle no citoesqueleto, quimiotaxia, motilidade e mediação da resposta inflamatória no processo celular (FONG; YANG; CHEN, 2017). Alguns desses processos podem ser desregulados nas doenças neoplásicas, colaborando para o crescimento, disseminação e invasão de células cancerígenas. Assim, essa proteína pode ter papéis na tumorigênese (FONG; YANG; CHEN, 2017), já tendo relatos relacionados ao crescimento neoplásico e metástase (MANAI et al., 2017). Em contrapartida, existem estudos que em certas neoplasias, essa proteína suprime a invasão do câncer (BICKEBÖLLER et al., 2015). Logo, a presença da MARCKS em abundância nos tecidos de margens de NIC 2 não possui ainda um papel tão esclarecido quanto a sua função no câncer cervical e suas lesões precursoras.

A calnexina é uma proteína que assegura o controle de qualidade bem como o dobramento apropriado das glicoproteínas sintetizadas recentemente (WILLIAMS, 2006). Na literatura, há trabalhos mostrando sua expressão altamente regulada em lesões do câncer cervical (RITZ et al., 2001).

Já a cofilina-1 é uma proteína reguladora do citoesqueleto da actina, a qual está envolvida na mitose, invasão tumoral e migração das células (MAIMAITI et al., 2017). No presente trabalho, a cofilina-1 foi encontrada em abundância nos tecidos de margem de NIC 3, sendo um dado interessante pois na literatura há relatos referentes a desregulação de proteínas associadas ao citoesqueleto no câncer de colo de útero, no qual a presença da cofilina-1 foi regulada positivamente nesse caso (PAPPA et al., 2017).

A proteína de ligação ao retinol 4 (RBP4) é secretada por adipócitos que colaboram para a resistência à insulina e está frequentemente associada ao nível elevado em humanos obesos (BERRY; NOY, 2017; WEIPING et al., 2006). Estudos relatam que a obesidade é um dos principais fatores a promover alguns tipos de câncer devido a aspectos envolvendo a atividade hormonal e metabólica da adiposidade visceral, como ocorre no câncer de colorretal (DE PERGOLA; SILVESTRIS, 2013; SIMÕES; BARBOSA, 2017), e também a proteína RBP4 já foi superexpressa em animais obesos (BERRY; NOY, 2017). Além disso, os níveis séricos da RBP4 já foram relatados na síndrome dos ovários policísticos (LINGAIAH et al., 2019). Contudo, não há relatos na literatura sobre a presença dessa proteína em pacientes com CCU ou NICs.

- **NIC 2: Lesão x Margem adjacente**

Com relação as análises diferenciais referentes a NIC 2 – lesão *versus* margem adjacente, identificou-se um total de 742 proteínas, sendo 423 proteínas compartilhadas entre si, 304 proteínas abundantes exclusivamente na lesão de NIC 2 e 15 proteínas exclusivas da margem de NIC 2 (Gráfico 7).

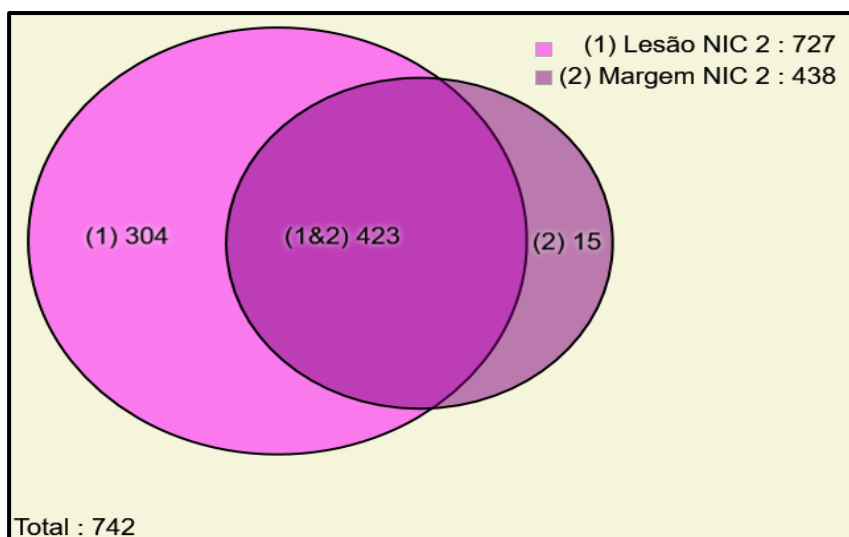


Gráfico 7 - Diagrama de Venn referente às proteínas expressas nas lesões de NIC 2 e suas margens adjacentes. Legenda: Proteínas expressas exclusivamente nas lesões de NIC 2 (rosa), proteínas expressas apenas na margem (lilás) e proteínas compartilhadas em ambas (roxo).

Dentre as proteínas expressas exclusivamente no cerne da lesão de NIC 2, encontram-se:

❖ **Desmocolina-2:** Esta é membro da super família de caderinas, a qual intercedem a adesão nos desmossomos (KHAN et al., 2017). A regulação negativa das proteínas do desmossomo em diversos tipos de câncer resulta na progressão do tumor (ZHOU et al., 2017). Essa proteína foi encontrada unicamente em duas amostras de NIC 2. Com relação ao câncer cervical, essa proteína já foi expressa em pacientes com câncer cervical no estágio inicial quando comparados a pacientes saudáveis (GÜZEL et al., 2018).

❖ **Polipeptídeo 2 associado à lâmina (TMPO):** Esta é uma proteína contida na membrana que interage diretamente com as lâminas do subtipo B, incluindo a LMNB1 (FURUKAWA; KONDO, 1998). No presente estudo, a proteína TMPO foi encontrada em quatro amostras de lesão NIC 2, tendo uma interação relevante com a LMB1 (descrita abaixo), como mostrado na Figura 21. Já há relatos na literatura sobre sua superexpressão em alguns tipos de câncer, como os do trato digestivo (KIM et al., 2012).

Contudo, não há achados sobre sua expressão no câncer cervical e em suas respectivas lesões precursoras.

❖ **Lâmina B1 (LMNB1):** Esta é membro da família de lâminas, que são as principais proteínas estruturais do núcleo da célula animal (DITTMER; MISTELI, 2011). A LMNB1 apresenta dados na literatura associando a sua superexpressão no câncer, como por exemplo, o de fígado (SUN et al., 2010), o de próstata (CORADEGHINI et al., 2006) e também no carcinoma de células renais (RADSPIELER et al., 2019). No câncer cervical, essa proteína foi expressa diferencialmente em tecidos cancerígenos após tratamento quimioterápico, sendo um potencial biomarcador associado ao efeito da quimioterapia (LIU et al., 2011).

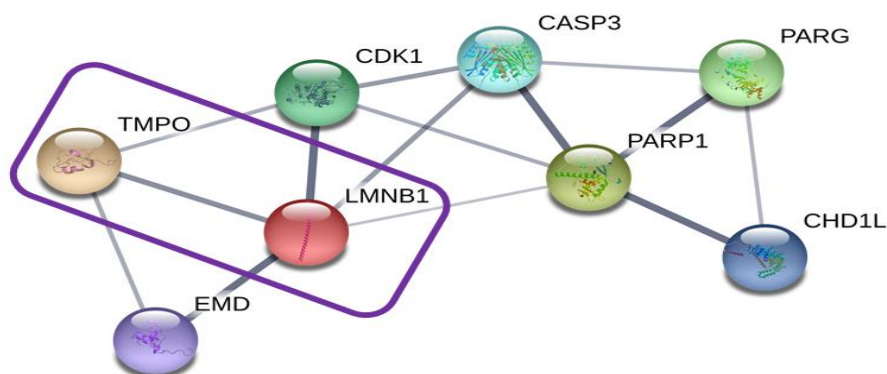


Figura 21 – Rede de interações da proteína TMPO através do programa STRING 11.0. As linhas na cor cinza mostram confiança de evidência na interação, sendo que quanto mais intenso é a cor e a linha, mais alta é a confiança (score > 0,9). **Fonte:** <http://string-db.org/>.

Já com relação as proteínas expressas exclusivamente na margem adjacente à lesão de NIC 2, encontram-se:

❖ **Dermatopontina:** Esta é uma proteína da matriz extracelular rica em tirosina, que está implicada na promoção de adesão celular e atividades relacionadas à montagem da matriz celular (TAKEUCHI, 2010; YAMATOJI et al., 2012). Existem relatos dessa proteína como um potencial preditor de metástases, como no câncer bucal humano (YAMATOJI et al., 2012). No presente estudo, a dermatopontina foi expressa unicamente em duas amostras de margem de NIC 2. Fato interessante pois no câncer cervical, a dermatopontina obteve uma baixa expressão em pacientes com câncer cervical escamoso quando comparado a pacientes controles (LOMNYTSKA et al., 2010). Sendo assim, sua presença na margem pode apresentar indícios de uma menor probabilidade de persistência da lesão.

❖ Elafina: Esta é uma proteína humana endógena expressa com predominância no tecido epitelial (SHAW; WIEDOW, 2011). A elafina atua como parte do escudo antiprotease presente no corpo, como por exemplo do trato reprodutivo feminino; sendo que a regulação da sua expressão ocorre por estímulos inflamatórios (GHOSH et al., 2010; PFUNDT et al., 1996; SHAW; WIEDOW, 2011). Quando os níveis de elafina se elevam no soro, pode indicar a presença de doenças inflamatórias, incluindo a psoríase (ALKEMADE et al., 1995). No estudo, essa proteína foi expressa unicamente em duas amostras de margem de NIC 2. Com relação ao tipo cervical, não há achados na literatura sobre a presença da elafina no câncer cervical e nas suas respectivas lesões precursoras. Contudo, existem relatos da elafina como biomarcador que cumpre funções duplas, servindo tanto para a detecção da doença quanto como um potencial alvo biologicamente terapêutico para câncer de mama e de ovário (FENG; DOBERSTEIN; DRAPKIN, 2015).

❖ Proteína B1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1): Esta é uma proteína nuclear que atua como um fator de ligação à cromatina que curva o DNA fornecendo assim, o acesso aos conjuntos de proteínas transcricionais que são alvos específicos do DNA (LOTZE; TRACEY, 2005). Sua superexpressão vem sendo associada às principais características do câncer, incluindo a progressão e formação de metástase (LOTZE; TRACEY, 2005; TANG et al., 2010). Já existem relatos na literatura associados a expressão da proteína HMGB1 em vários tipos de câncer, como o colorretal (HAPCA et al., 2018) e o de ovário (LI; WEI, 2018). No presente estudo, a HMGB1 foi encontrada em três amostras de tecidos da margem adjacente à lesão de NIC 2. Esse fato é intrigante, visto que existe uma correlação da expressão de HMGB1 com o potencial de malignidade da neoplasia intraepitelial cervical bem como o HPV (SONG et al., 2015). Estudos mostram que pacientes com maior expressão da HMGB1 possuem uma taxa de recorrência elevada da infecção pelo HPV de alto risco quando comparados com aqueles que apresentam baixa expressão de HMGB1 (PANG et al., 2014). Sendo assim, a HMGB1 é um potencial candidato a biomarcador para avaliação tanto da persistência da infecção pelo HPV de alto risco como também para a progressão da NIC (PANG et al., 2014; SONG et al., 2015). Além disso, um estudo relatou que elevados níveis de HMGB1 apresentam um potencial a marcador para prognóstico precoce em pacientes com câncer cervical recorrente (SHENG et al., 2009). Ao realizar a análise de interação da proteína HMGB1 (Figura 22), notou-se que esta proteína interage com a proteína B2 do grupo de alta mobilidade (HMGB2), que no presente estudo foi identificada tanto nos

tecidos com lesões de NIC 2 quanto em tecidos das margens adjacentes de NIC 2. Dados já demonstraram a interação de HMGB1 e HMGB2 presente em células epiteliais, que estão envolvidas em processos celulares e são modificadas nas células cancerígenas (BARREIRO-ALONSO et al., 2018). Assim sendo, essas proteínas fornecem um papel importante relacionado aos mecanismos e evolução do câncer.

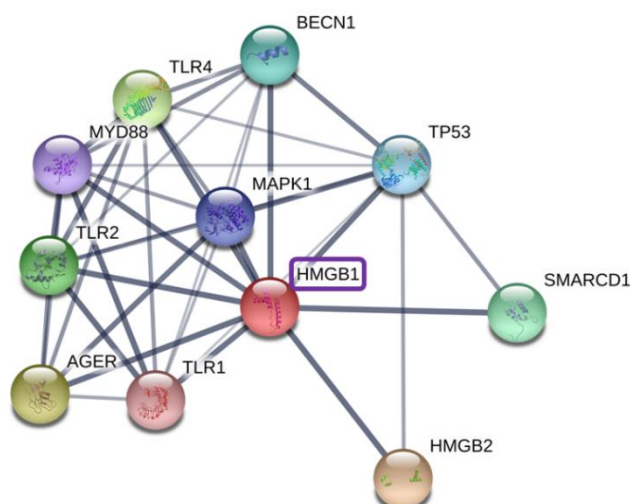


Figura 22 – Rede de interações da proteína HMGB1 através do programa STRING 11.0. As linhas na cor cinza mostram confiança de evidência na interação, sendo que quanto mais intenso é a cor e a linha, mais alta é a confiança (*score* > 0,9). **Fonte:** <http://string-db.org/>.

- **NIC 3: Lesão x Margem adjacente**

Com relação a NIC 3 – lesão *versus* margem, foram identificadas um total de 573 proteínas, sendo 281 proteínas compartilhadas entre si, 272 proteínas exclusivas em lesão de NIC 3 e 20 proteínas expressas unicamente na margem de NIC 3, como mostrado no Gráfico 8.

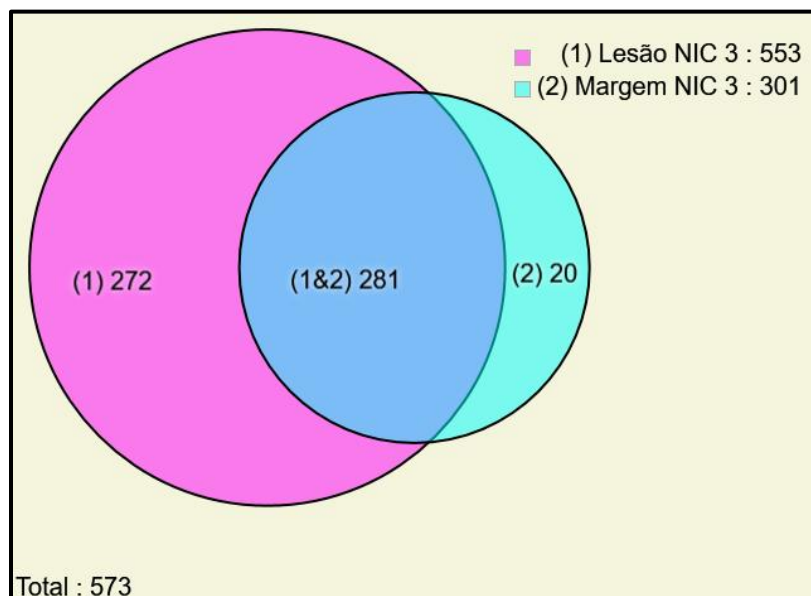


Gráfico 8 - Diagrama de Venn referente às proteínas expressas nas lesões de NIC 3 e suas margens adjacentes. Legenda: Proteínas expressas exclusivamente nas lesões de NIC 3 (rosa), proteínas expressas apenas na margem (azul turquesa) e proteínas compartilhadas em ambas (azul).

Dentre as proteínas expressas exclusivamente no cerne da lesão de NIC 3, encontram-se:

- ❖ Homólogo da proteína 42 de controle da divisão celular (CDC42): Essa proteína é membro da família Rho GTPases, que são sinalizadores intracelulares, atuando na regulação do citoesqueleto (SOUZA, 2016). Existem relatos de que a desregulação de CDC42 pode causar alterações no funcionamento normal das células, sendo correlacionada com uma variedade de processos patogênicos, incluindo o câncer. Assim, quando se mantém o nível de CDC42 nas células, tem-se a possibilidade do controle da progressão tumoral (QADIR; PARVEEN; ALI, 2015). No presente estudo, essa proteína foi encontrada em quatro amostras de pacientes com lesão de NIC 3 quando comparado à margem adjacente. Curiosamente, a expressão da proteína CDC42 presente em tecidos com NIC 3 já foi relatada na literatura, na comparação com tecidos normais do colo do útero, NIC 1, NIC 2 e CCU (FENG; FANG; LI, 2016). Como resultado, notou-se que a proteína CDC42 possui expressão, crescendo gradualmente de acordo com a evolução até o câncer cervical (FENG; FANG; LI, 2016). Ao analisar a rede de interação dessa proteína (Figura 23), observa-se a interação dessa proteína com a ACTR2 e ACTR3 (descrita abaixo).

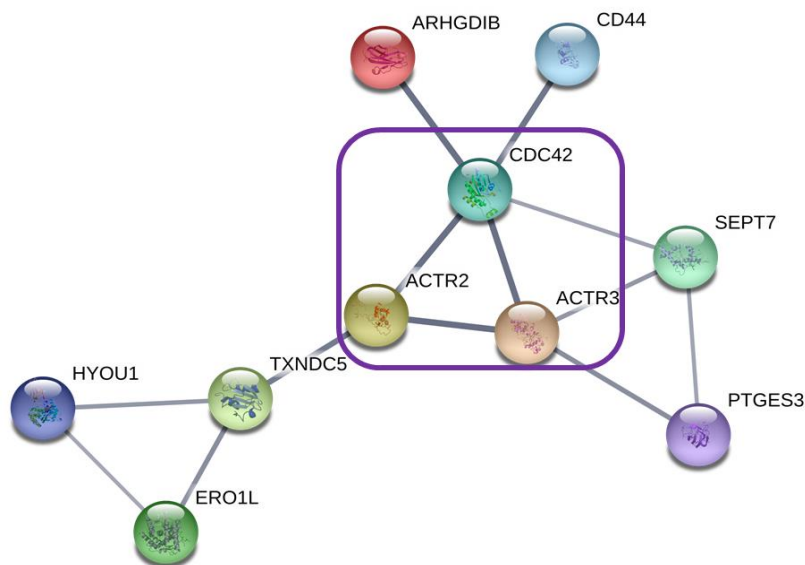


Figura 23 – Rede de interações da proteína CDC42 através do programa STRING 11.0. As linhas na cor cinza mostram confiança de evidência na interação, sendo que quanto mais intenso é a cor e a linha, mais alta é a confiança (score > 0,9). **Fonte:** <http://string-db.org/>.

A partir da atividade na mediação da polimerização de actina por meio do complexo ARP2/3, a proteína CDC42 proporciona a formação de estruturas dos invasópodas, que são projeções de membrana amplamente ricas em actina e que atuam na degradação da matriz constituída por células cancerígenas invasivas (YAMAGUCHI et al., 2005). Portanto, a partir da regulação e formação de invasópodas, a ativação da proteína CDC42 proporciona a invasão das células cancerígenas (STENGEL; ZHENG, 2011; YAMAGUCHI et al., 2005).

❖ Proteína 2 e 3 relacionada à actina (ACTR2 e ACTR3): Estas proteínas são componentes de ligação a ATP do complexo ARP2/3, a qual é considerada a única máquina molecular que classifica as redes de actina ramificadas (MACHESKY et al., 1994; MOLINIE; GAUTREAU, 2017). Dados da literatura apontam que a superexpressão do complexo ARP2/3 na maioria das vezes proporciona a progressão do câncer (MOLINIE; GAUTREAU, 2017), sendo esta encontrada em diferentes tipos de câncer como por exemplo, o de pulmão (SEMBA et al., 2006), de mama (IWAYA; NORIO; MUKAI, 2007) e colorretal (OTSUBO et al., 2004). Com relação a proteína ACTR3, a sua superexpressão está presente no câncer gástrico (ZHENG et al., 2008) e no colorretal (OTSUBO et al., 2004). No presente estudo, a proteína ACTR2 e ACTR3 foram encontradas em quatro amostras de pacientes com NIC 3. Vale ressaltar que, não há achados na literatura sobre a presença dessas proteínas relacionadas às lesões precursoras do CCU.

Já com relação as proteínas expressas apenas na margem adjacente da lesão de NIC 3, encontram-se:

❖ Cornifina-B: Essa proteína é membro da família conhecida como pequenas proteínas ricas em prolina (SPRRs), sendo uma subclasse de proteínas estruturais. Diversos estudos indicam que essas proteínas podem estar interligadas a maior proliferação epitelial bem como a processos malignos (CARREGARO et al., 2013). Em adição, na literatura também há dados da expressão dessa proteína relacionada a doenças cutâneas hiperplásicas (FUJIMOTO et al., 1997) bem como em doenças como o câncer cervical (STARODUBTSEVA et al., 2019). No presente estudo, essa proteína foi encontrada em duas amostras da margem de NIC 3, mostrando similaridade com os dados da literatura; visto que a presença da proteína cornifina-B foi encontrada em baixa abundância em lesões de alto grau do câncer de colo de útero (POTTIER et al., 2019).

❖ Cadeia leve da ferritina (FTL): Essa proteína é uma subunidade da família ferritina, a qual desempenha o papel de armazenamento de ferro a longo prazo (AROSIO; INGRASSIA; CAVADINI, 2009). A proteína FTL já foi expressa diferencialmente em diferentes tipos de tumores como, o glioblastoma (WU et al., 2016), o gástrico e o hepatocelular (PARK et al., 2002). No presente estudo, essa proteína foi encontrada unicamente em três amostras de margens adjacentes de NIC 3. Ao realizar a rede de interação dessa proteína (Figura 24), foi possível verificar a sua interação com a proteína FTH1 (descrita abaixo). Uma suposição quanto a essas proteínas, subunidades da ferritina, é que estas podem ter um papel multifuncional no decorrer da tumorigênese, podendo ter significância funcional incluindo o fator proliferativo/angiogênico (devido à presença da proteína FTL) ou imunossupressor (devido à presença da proteína FTH1) (ALKHATEEB; CONNOR, 2013; MOTZ; COUKOS, 2011). Assim, a presença de FTL e FTH1 em um único complexo celular pode contribuir em diversos aspectos da tumorigênese (BERTOLI et al., 2019; ROSAGER et al., 2017); porém, não há achados dessas proteínas relacionados ao câncer cervical, bem como suas lesões precursoras.

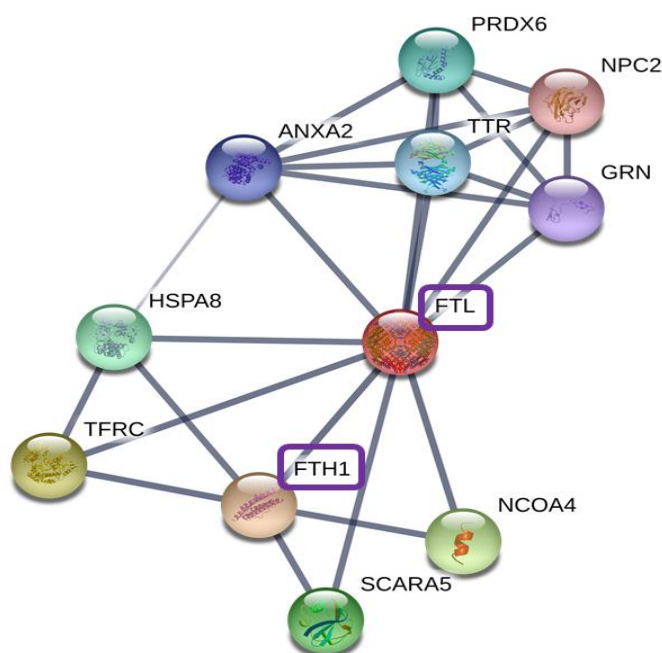


Figura 24 – Rede de interações da proteína FTL através do programa STRING 11.0. As linhas na cor cinza mostram confiança de evidência na interação, sendo que quanto mais intenso é a cor e a linha, mais alta é a confiança (*score* > 0,9). **Fonte:** <http://string-db.org/>.

❖ Cadeia pesada da ferritina (FTH1): Essa proteína atua na rápida captação e liberação do ferro (AROSIO; INGRASSIA; CAVADINI, 2009). Contudo, existem evidências da multifuncionalidade da cadeia pesada de ferritina, desenvolvendo papéis na proliferação celular (TORTI; TORTI, 2002) e angiogênese (COFFMAN et al., 2009). No contexto do câncer, essa proteína já foi expressa diferencialmente em vários pacientes com essa doença, incluindo o de próstata (SU; LEI; ZHANG, 2017) e o de ovário (LOBELLO et al., 2016), bem como em metástase do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HU et al., 2019). Não há achados na literatura da sua expressão relacionada ao câncer cervical e suas lesões precursoras, sendo que a proteína FTH1 foi encontrada em duas amostras do estudo realizado.

Além das análises diferenciais referentes a lesão de NIC 2 *versus* margem adjacente e a lesão NIC 3 *versus* sua margem adjacente, também foi possível identificar as proteínas mais abundantes em cada condição. Com relação a NIC 2 comparada com a sua respectiva margem adjacente, foi possível verificar que anexina A6 está em abundância nas amostras de lesão NIC 2, da mesma forma que a transtirretina na margem adjacente (Tabela 7).

Tabela 7 – Lista de algumas proteínas diferencialmente abundantes quando comparados cerne da lesão de NIC 2 e margem adjacente de NIC 2*.

ID	SEqCount	SpectCount	LogFOLD	Descrição
P62888	5	17	1.177	60S proteína ribossômica L30
Q01469	17	110	0.511	Proteína de ligação a ácidos graxos 5
P08133	12	46	0.951	Anexina A6
P08123	5	20	-0.756	Cadeia de colágeno alfa-2 (I)
P08311	3	8	-0.994	Catepsina
P02766	2	8	-0.505	Transtirretina

*Nas colunas tem-se: o ID do UniProt, a contagem da sequência peptídeo (SeqCount), a contagem espectral (SpecCount), a variação da média de logFold dos peptídeos referentes a proteína descrita. Os valores de logFold positivo representam proteínas abundantes na lesão NIC 2, já os valores negativos representam proteínas abundantes na margem NIC 2.

A anexina A6 (ANXA6) é uma proteína pertencente à família das anexinas, que são proteínas de ligação à membrana dependentes de Ca^{2+} (GERKE; MOSS, 2002). Essa proteína participa de várias funções como a organização da membrana e do citoesqueleto, e adesão celular (RESCHER; GERKE, 2004). Diversos estudos apontam que a anexina A6 pode estar associada tanto na progressão quanto na malignidade do câncer cervical, sendo um potencial marcador no desenvolvimento do CCU (LOMNYTSKA et al., 2010, 2011; QI et al., 2015). Em adição, também foi detectado a expressão diferencial dessa proteína nas NICs comparado ao câncer cervical, onde a anexina A6 obteve uma expressão positiva no CCU (LOMNYTSKA et al., 2011).

Já a transtirretina (TTR) é uma proteína amiloidogênica, a qual de acordo com relatos na literatura possui potencial a biomarcador de alguns tipos de câncer, como o de ovário (IZADYAR, 2017; ZHANG et al., 2004). Além disso, já existem dados dessa proteína em lesões precursoras do câncer de colo de útero, onde se verificou uma maior expressão em NIC 3 quando comparado a NIC 2 (BARBA DE LA ROSA et al., 2008; ULEBERG et al., 2011). Tal resultado é interessante pois, obtivemos uma maior abundância nas margens adjacentes à lesão de NIC 2 e isso pode apontar o início da evolução do grau de NIC 2 para NIC 3; porém, são necessárias maiores investigações dessa proteína perante esses dados.

Ao comparar a lesão de NIC 3 com a sua respectiva margem adjacente, foi possível verificar que a proteína complemento C3 foi uma das mais expressas na lesão de NIC 3, enquanto o colágeno tipo I alfa 1 foi a proteína mais abundante na margem adjacente NIC 3 (Tabela 8).

Tabela 8 – Lista de algumas proteínas diferencialmente abundantes quando comparados cerne da lesão de NIC 3 e margem adjacente de NIC 3*.

ID	SEqCount	SpectCount	LogFOLD	Descrição
P01024	61	306	0.308	Complemento C3
P62937	10	52	0.636	Peptidilprolil cis-trans isomerase A
P06733	18	92	0.665	Alfa-enolase
P02452	6	35	-0.906	Colágeno tipo I alfa 1
P08123	11	56	-0.579	Cadeia de colágeno alfa-2 (I)
P07476	15	56	-0.591	Involucrin

*Nas colunas tem-se: o ID do UniProt, a contagem da sequência peptídeo (SeqCount), a contagem espectral (SpecCount), a variação da média de logFold dos peptídeos referentes a proteína descrita. Os valores de logFold positivo representam proteínas abundantes na lesão NIC 3, já os valores negativos representam proteínas abundantes na margem NIC 3.

A proteína complemento C3 é a molécula central na cascata do complemento, sendo sua expressão crucial para ativar as três vias do complemento (a clássica, a alternativa e a lectina). Seu funcionamento é fundamental para a destruição de microrganismos invasivos e também na limpeza de células apoptóticas (DE VISSER; KORETS; COUSSENS, 2004; SAHU; LAMBRIS, 2001). Dados na literatura apontam que a C3 possui uma expressão elevada em NIC 3 quando comparado a mulheres saudáveis (CANALES et al., 2014). Esse dado condiz com o nosso estudo, pois a C3 foi mais abundante em lesões de NIC 3. Adicionalmente, estudos relatam que mudanças no complemento podem influenciar no desenvolvimento do tumor, pois essas proteínas possuem atuação em processos de proliferação, angiogênese, invasão e sobrevivência (PIO; AJONA; LAMBRIS, 2013). Assim, há a possibilidade de que as proteínas referentes ao sistema complemento como o C3, possam atuar como coadjuvantes para o desenvolvimento das lesões precursoras do câncer de colo de útero. Contudo, ainda é preciso maiores investigações quanto a essa hipótese.

O colágeno tipo I alfa 1 (COL1A1) é pertencente ao grupo I da família colágeno, incluindo COL1A1 e COL1A2 (CHAN et al., 2008). Alguns estudos relataram a alta regulação do COL1A1 em casos de câncer, desempenhando papéis relevantes na invasão e metástase das células cancerígenas como por exemplo, no gástrico (LI; DING; LI, 2016). Recentemente, foi realizado um estudo da expressão de COL1A1 em tecidos com câncer cervical, onde se verificou que a expressão aumentou significativamente no câncer cervical quando comparado com tecidos normais. Além disso, o estudo mostrou ainda que o COL1A1 exerce um papel fundamental na anti-apoptose das células

cervicais induzidas pela radiação (LIU; LIAO; LI, 2017). Logo, a sua maior abundância na margem adjacente à lesão de NIC 3 pode ser preocupante devido aos indícios relatados.

Diante do exposto nesse capítulo, foi possível mostrar que as lesões de alto grau bem como suas respectivas margens adjacentes possuem perfis proteicos diferenciais que contribuem para o entendimento a nível molecular dessas neoplasias. Sabe-se que a distinção entre o diagnóstico de NIC 2 e NIC 3 não possui efeito no acompanhamento e/ou tratamento de cada paciente, pois todas estas a princípio serão submetidas a conização, independente do diagnóstico. Porém, nesse estudo foi possível observar diferenças no nível de proteínas entre tais lesões e isso pode colaborar tanto no diagnóstico mais preciso quanto no tratamento mais individualizado, visto que em NIC 2 ainda existe maiores chances de regressão da doença.

Capítulo III

Análise Metabolômica

3. ANÁLISE METABOLÔMICA

3.1 Metabolômica

O termo metabolômica refere-se ao estudo de perfis metabólicos presentes em plantas, microrganismos, amostras biológicas e células isoladas. De forma geral, é uma ciência que permite a investigação da atividade e do metabolismo celular através de moléculas com pequena massa molecular (compostos orgânicos) que podem integrar sistemas biológicos, sendo produtos e substratos das reações químicas presente nestes (LIU; LOCASALE, 2017; MEIER et al., 2017; ROUX et al., 2011).

O metaboloma, denominado como o conjunto completo de metabólitos gerados em uma célula, possibilita investigar as correlações entre a bioquímica e o fenótipo celular (ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015; PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012). Em contrapartida, com relação aos genes e proteínas, na qual a função está submetida respectivamente à regulação epigenética e às modificações pós-traducionais, os metabólitos podem ser considerados assinaturas diretas da atividade bioquímica; tendo uma leitura mais acessível de correlação com o fenótipo de uma célula ou tecido em resposta a alterações ambientais ou genéticas (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012; VILLAS-BÔAS et al., 2005). De modo que, tal característica tornou-se de grande importância para a realização de análises relacionadas aos metabólitos (ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015; PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012).

Nesta abordagem, o metabolismo celular é compreendido de fato como uma rede complexa de reações as quais estão altamente interligadas e ordenadas; de tal maneira que, mesmo ocorrendo mínimas alterações podem causar modificações simultâneas em vários metabólitos, possibilitando revelar quais fatores têm influência direta em uma dada função biológica (MARASCHIN et al., 2017).

Com o aprimoramento de ferramentas analíticas, como a espectrometria de massas, tornou-se possível utilizar pequenas quantidades de amostra para verificar simultaneamente milhares de metabólitos presentes em um dado material analisado (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012). Frente a isso, diferentes estratégias têm sido empregadas como por exemplo: a metabolômica alvo (do inglês – *targeted metabolomics*) e metabolômica global (do inglês – *untargeted metabolomics*). A abordagem *targeted metabolomics* pode ser definida como uma análise quantitativa de um ou mais metabólitos relacionados a uma reação metabólica específica, ou seja, é

direcionada a uma classe ou composto químico previamente determinado. Em contrapartida, a *untargeted metabolomics* se baseia em uma análise qualitativa que tem como objetivo medir simultaneamente o maior número possível de metabólitos provenientes do sistema biológico em estudo, sem um “alvo” prévio (CANUTO et al., 2018).

Uma série de etapas é recomendada para a realização de estudos metabolômicos, descritas resumidamente na Figura 25. Cada uma dessas estratégias tem suas vantagens e desvantagens, sendo que a escolha do método depende do objetivo experimental. A metabolômica alvo possui alta sensibilidade e especificidade, na qual todos os metabólitos são selecionados antes da análise, tornando a interpretação mais fácil. Porém, alguns metabólitos não estão disponíveis comercialmente ou seus padrões químicos são muito caros, sendo um fator limitante desse tipo de análise (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012). Já a metabolômica global pretende detectar quase todos os metabólitos presentes na amostra. Todavia, a sensibilidade e especificidade deste método não são tão altas como na metabolômica alvo, e ainda há uma maior complexibilidade na análise dos dados (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012).

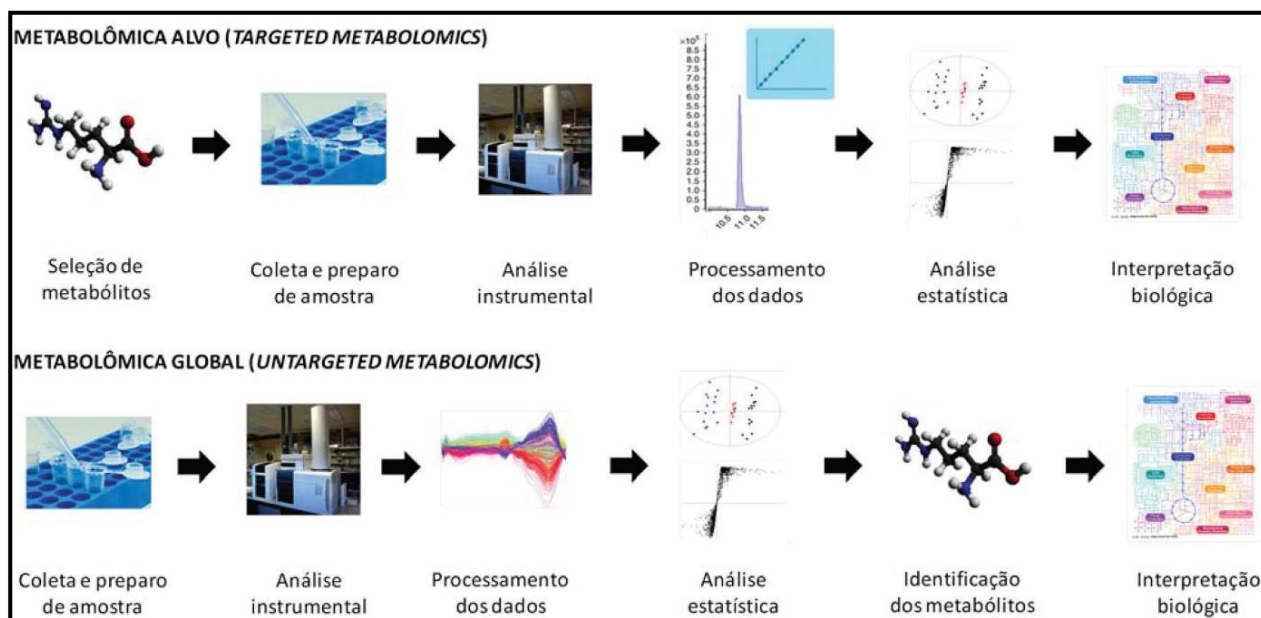


Figura 25 - Representação esquemática de duas abordagens empregadas em metabolômica, a *targeted* e a *untargeted*. **Fonte:** Canuto et al., 2018.

Nos últimos anos, nota-se o crescimento e a aplicabilidade da metabolômica em várias áreas de importância tecnológica. Nesse sentido, pode-se citar estudos relacionados a determinação do metaboloma diferencial de alimentos transgênicos e não

transgênicos (KEYMANESH; DARVISHI; SARDARI, 2009), associados a diversidade biológica de espécies com interesse medicinal (CHASSAGNE et al., 2018), bem como na identificação de possíveis marcadores bioquímicos de doenças como Alzheimer (GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ; SAYAGO; FERNÁNDEZ-RECAMALES, 2017; LIN et al., 2017; TRUSHINA; MIELKE, 2014), diabetes (MAO et al., 2017) e o câncer (YUMBA MPANGA et al., 2018; ZHANG et al., 2017) incluindo o tipo cervical (YANG et al., 2017).

3.2 Metabolômica aplicada ao câncer

O câncer é uma doença agressiva que causa alterações no metabolismo de uma célula bem como no microambiente ao seu redor. Avanços na área da metabolômica têm permitido uma averiguação mais detalhada do metabolismo do câncer contribuindo para um melhor entendimento do funcionamento das células cancerígenas relacionadas a sua proliferação tumoral e vascularização (BEGER, 2013). Nesse sentido, a abordagem metabolômica vem sendo empregada para a descoberta de biomarcadores para o diagnóstico de câncer na área clínica, fornecendo pistas que podem proporcionar futuramente um tratamento mais personalizado para pacientes com esta doença (BEGER, 2013). Alguns exemplos são aplicados ao câncer de colorretal (UCHIYAMA et al., 2017), de próstata (OSSOLÍNSKI et al., 2019), de pulmão (MORENO et al., 2018), gástrico (LARIO et al., 2017), endometrial (BAHADO-SINGH et al., 2017) e o cervical (ZHOU et al., 2019a).

Zhou e colaboradores (2019a) realizaram um estudo transversal com amostras de plasma de três grupos de pacientes com carcinoma de células escamosas cervicais (CECS): pacientes primários antes de qualquer tratamento, pacientes com prognóstico ruim (pacientes com metástase distante e recorrência local) e pacientes com um bom prognóstico (pacientes sem recorrência e metástase distante dentro de 2 anos após tratamento), utilizando UPLC-QTOF-MS, para determinar os metabólitos mais discriminantes. O resultado deste estudo mostrou que 31 metabólitos foram significativamente diferentes entre os três grupos estudados. Desses, os cinco metabólitos – fosfatidil colina, fosfatidil glicerol, actosilceramida, D-maltose e ácido ftálico, foram identificados como biomarcadores em potencial (ZHOU et al., 2019a). Um outro estudo realizado por Yang e colaboradores (2017) demonstraram que variáveis da metabolômica e da transcriptômica estão associadas ao câncer cervical; de forma que especialmente em metabolômica, cinco metabólitos (bilirrubina, LysoPC, n-oleoil-

treonina, ácido 12-hidroxidodecanóico e ácido tetracosahexaenóico) foram selecionados como possíveis biomarcadores de diagnóstico.

Estudos sobre as lesões precursoras do câncer de colo de útero têm mostrado indícios de diferentes metabólitos que possam auxiliar na discriminação de pacientes com câncer cervical, NICs e pacientes normais (Figura 26). Um estudo realizado por Khan e colaboradores (2019) utilizou amostras de plasma de pacientes saudáveis em comparação com amostras de pacientes com NIC 1, NIC 2/3 e com câncer de colo de útero para identificar metabólitos discriminantes, presentes em cada amostra utilizando a técnica UPLC-QTOF-MS. Dentre os metabólitos identificados, destacou-se AMP (adenosina monofosfato), aspartato, glutamato, hipoxantina, lactato, prolina e piroglutamato, sendo diferenciais entre as NICs e o câncer de colo de útero (KHAN et al., 2019). Assim, esse estudo mostrou que existem metabólitos capazes de distinguir essas lesões do CCU que podem atuar como biomarcadores para o diagnóstico precoce.

Além disso, já existem trabalhos relacionados ao principal fator etiológico do câncer cervical e suas respectivas lesões precursoras: o HPV. Dentre os estudos, tem-se a investigação tanto da microbiota do trato cervico-vaginal atuando de maneira susceptível à infecção do HPV (ILHAN et al., 2019; ORTIZ et al., 2018), como também buscando biomarcadores para a detecção precoce desse vírus (GODOY-VITORINO et al., 2018).

No estudo de Godoy-Vitorino e colaboradores (2018) analisou-se amostras de urina de mulheres submetidas à avaliação ginecológica, utilizando a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) para discriminar pacientes com diversas categorias de tipos de HPV. Dentre os resultados obtidos, destacaram-se três metabólitos urinários: 5-oxoprolinato, ácido eritrônico e ácido N-acetil-aspartico, que se diferenciaram dos casos de HPV de alto risco em pacientes que não tinham o vírus (GODOY-VITORINO et al., 2018).

Adicionalmente, em um outro trabalho realizado por Porcari e colaboradores (2018) utilizando a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) em amostras de colo uterino normal e com lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL), observou-se assinaturas moleculares específicas para HSIL e para mulheres sem lesão cervical. Desta forma, chama a atenção o potencial do uso de ferramentas como o LC-MS para o uso clínico na triagem do colo do útero.

Assim, através da análise metabolômica é possível identificar metabólitos associados a lesão e ao câncer cervical contribuindo assim para o melhor entendimento da influência destes frente a alterações da doença (PORCARI et al., 2018; YE; LIU; SHI, 2015).

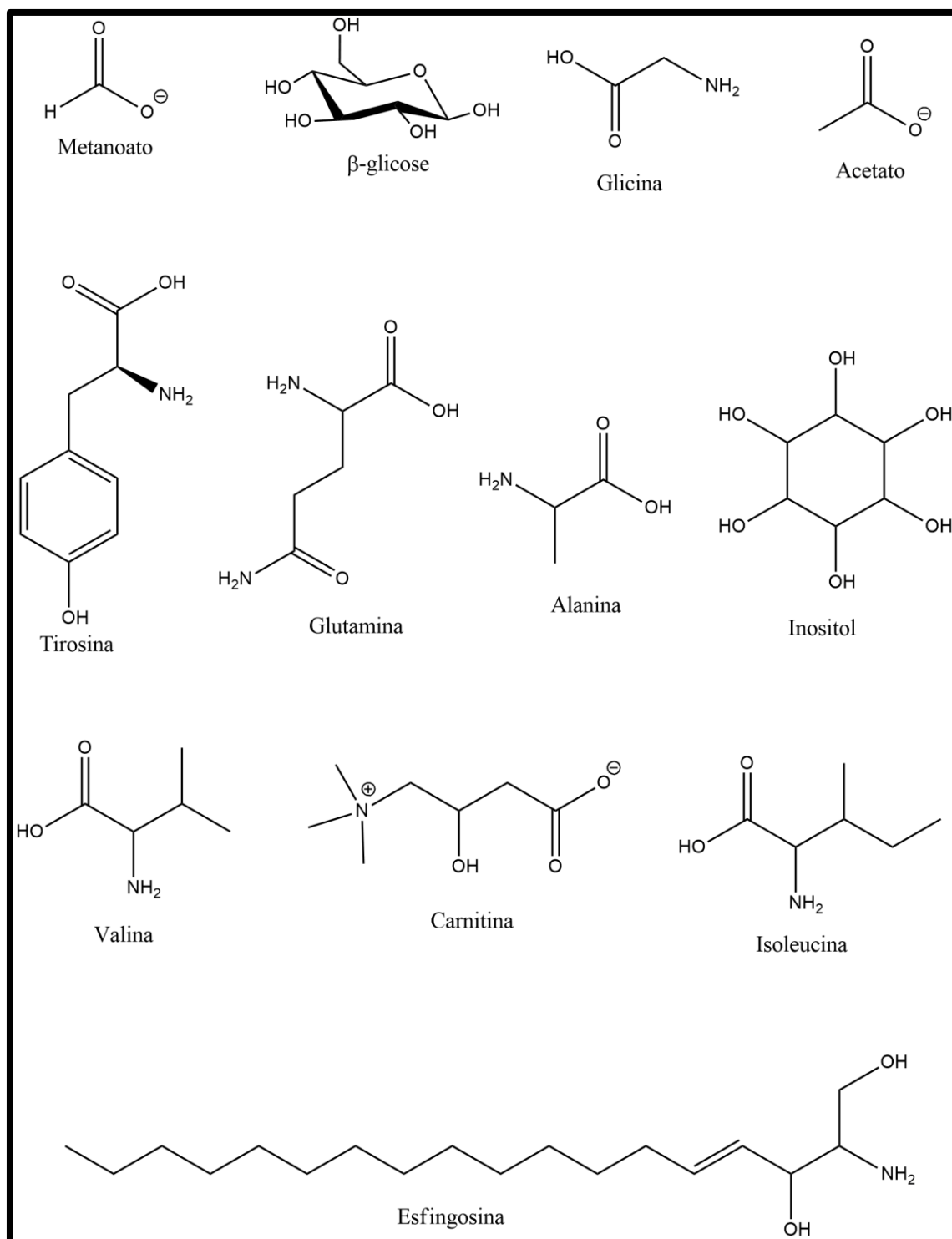


Figura 26 – Metabólitos diferenciais encontrados ao comparar pacientes com câncer de colo de útero, neoplasias intraepiteliais cervicais e pacientes normais.

Fonte: PORCARI et al., 2018; YE; LIU; SHI, 2015.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Seleção de pacientes

Para o estudo metabolômico foram selecionadas 52 pacientes de acordo com os critérios relatados a seguir. Vale ressaltar que as etapas referentes aos itens: população de estudo, coleta de dados e de amostras biológicas bem como a preservação das mesmas já foram descritas no capítulo anterior.

- **Local do estudo**

As coletas das amostras foram realizadas na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON). Posteriormente, estas foram armazenadas no Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz Amazônia). As análises de metabolômica foram realizadas no Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico - UFRJ (LADETEC), especificamente no Laboratório de Metabolômica (LABMETA).

- **Critérios de inclusão**

Pacientes acima de 18 anos que concordaram em participar do projeto, que tivessem indicação cirúrgica para o procedimento de conização pela equipe clínica da Fundação CECON e com laudo histopatológico pré e pós-operatório de neoplasia intraepitelial de alto grau (NIC 2 e NIC 3). Além disso, as pacientes deviam ser virgens de tratamento cervical.

- **Critérios de exclusão**

Foram excluídas da pesquisa pacientes grávidas ou que não apresentavam um estado clínico favorável para a coleta do material cervical. E ainda, pacientes que possuem a presença ou histórico de qualquer tipo de carcinoma no momento da coleta das lesões precursoras, não foram incluídas no projeto.

3.3.2 Estudo metabolômico das NICs de alto grau

3.3.2.1 Preparo das amostras

Para a otimização do processo de preparo das amostras de tecidos foram empregadas três metodologias:

- Metodologia 1

Pesou-se 15 mg de tecido e transferiu-se para um microtubo. Então, a amostra foi submetida ao método de maceração congela-descongela, que consiste em um ciclo de congelamento no nitrogênio líquido (durante 10 min) e descongelamento na geladeira (durante 10 min). Esse processo foi repetido três vezes. Após isso, a amostra foi submetida à adaptação da extração tipo *Matyash* descrita no item 3.3.2.2.

- Metodologia 2

Pesou-se 10 mg de tecido e transferiu-se para um microtubo. Depois, cinco esferas metálicas foram adicionadas no microtubo contendo o tecido e realizou-se uma agitação em um vórtex. Posteriormente, a amostra foi submetida ao processo de maceração congela-descongela descrito na metodologia 1. Em seguida, a amostra foi submetida à adaptação da extração tipo *Matyash* (item 3.3.2.2).

- Metodologia 3

Pesou-se 5 mg de tecido e transferiu-se para um microtubo. Posteriormente, adicionou-se três esferas metálicas no microtubo contendo o tecido e realizou-se uma agitação em um vórtex. Em seguida, a amostra foi submetida à adaptação da extração tipo *Matyash* (item 3.3.2.2). Vale ressaltar que a massa do tecido foi normalizada pela ressuspensão (Tabela 9) e pelo volume de injeção das amostras.

Tabela 9 – Ressuspensão das amostras da otimização para o estudo metabolômico.

Ressuspensão	Metodologia 1 (M1)	Metodologia 2 (M2)	Metodologia 3 (M3)
Fase aquosa	500 µL	200 µL	200 µL

Posteriormente, as amostras foram transferidas para *vials* e analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CL-EMAR). Além disso, foi preparado o controle de qualidade (*Quality Controls* – QC) misturando em um único *vial*, volumes iguais de cada amostra pertencentes a todos os grupos (NIC 2 – lesão e margem/NIC 3 – lesão e margem). O QC foi analisado no decorrer da sequência, a cada dez injeções de amostras, com a finalidade de obter a medida de estabilidade e repetibilidade do método utilizado (GIKA et al., 2008).

Após a escolha da metodologia, definiu-se o peso das amostras a serem utilizadas, o modo de ressuspensão e o volume de injeção para o estudo metabolômico,

como mostrado na Tabela 10.

Tabela 10 – Ressuspensão e volume de injeção das amostras para o estudo metabólico.

Peso das amostras	Ressuspensão	Volume de Injeção
10 mg	50 µL	5 µL
5 mg	50 µL	10 µL
2,5 mg	25 µL	10 µL

3.3.2.2 Método tipo *Matyash* (Adaptação)

A extração tipo *Matyash* é um método que utiliza um sistema bifásico (MTBE/metanol/água) para extrair os compostos polares (metanol/água) e apolares (MTBE) separadamente (MATYASH et al., 2008). Essa extração foi escolhida com o intuito de fazer uma purificação das amostras e retirar as moléculas apolares que poderiam comprometer as análises e compostos de interesse.

Após a maceração dos tecidos, adicionou-se 300 µL de metanol seguido de homogeneização durante 15 minutos em banho ultrassônico. Em seguida, foi adicionado 1000 µL de éter terc-butilico (MTBE) e 250 µL de água Milli-Q e homogeneizou-se por 15 minutos em banho ultrassônico; sendo que o volume final foi de 1550 µL. Posteriormente, as amostras foram submetidas a incubação por 15 minutos a 4°C e centrifugou-se durante 10 minutos a 9000 rpm. Em seguida, foi removida a fase orgânica superior (MTBE) e a fase aquosa inferior (metanol/água) foi transferida para um novo microtubo. Estas amostras foram secas a 40°C em fluxo de nitrogênio e armazenadas em um freezer -30°C até o momento da análise por CL-EMAR.

3.3.2.3 Aquisição de dados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CL – EMAR)

Inicialmente, as amostras contendo os metabólitos polares, foram ressuspensas com uma solução de ACN:H₂O 1:1 (v/v). As análises por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CL-EMAR) foram realizadas utilizando o cromatógrafo líquido Dionex Ultimate 3000 UHPLC acoplado ao espectrômetro de massas híbrido Quadrupolo-Orbitrap modelo Q-Exactive Plus (Thermo Scientific), com fonte de ionização por *electrospray* (ESI).

Para a separação cromatográfica, foi empregada uma coluna Waters *Xbridge Amide* (150 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 3,5 μm) mantida a 40°C. A fase móvel utilizada foi: água Milli-Q contendo 10mM de acetato de amônio e 0,04% de hidróxido de amônio (fase móvel A); e 95% de acetonitrila contendo 10mM de acetato de amônio, 0,04% de hidróxido de amônio e 5% de água Milli-Q (fase móvel B). O volume de injeção das amostras foi de 5 μL . A eluição por gradiente foi realizada com uma vazão de 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ seguindo o seguinte método: 0-2 min 95% B; 2-18 min 50% B; 18-21 min 50% B; 21-22 min 95% B; 22-28 min 95% B. O tempo total da análise foi de 28 minutos.

Para a análise por espectrometria de massas, a fonte de ionização foi mantida na posição C e os seguintes parâmetros do *Tune* foram utilizados: vazão do gás de bainha, gás auxiliar e gás de varredura de 50, 10 e 0 unidades arbitrárias (u.a), respectivamente; voltagem do spray de 3,9 kV no modo positivo; temperatura do capilar de 300 °C; RF das lentes empilhadas de 50 v; temperatura da fonte de 380°C. O experimento de varredura total de íons (*Full Scan*) foi realizado no modo positivo, na faixa de m/z 100-1000 com resolução 35.000, AGC de 5×10^5 e tempo de injeção de 120 ms; seguido do experimento de aquisição dependente dos dados (ddMS2) utilizando resolução de 17.500, AGC de 1×10^5 , tempo de injeção de 50 ms, energia de colisão normalizada (NCE) de 15-40 eV e janela de isolamento de 1,2 Da.

3.3.2.4 Análise de dados

A análise dos dados epidemiológicos das mulheres participantes do estudo metabólico foi realizada pelo *software* MiniTab 18, da mesma maneira descrita no estudo proteômico (item 2.3.4.7).

Através dos dados obtidos dos perfis de metabólitos, foram realizadas análises estatísticas multivariadas com o intuito de observar os possíveis perfis metabólitos diferenciais e discriminantes presentes nos tecidos das lesões e suas respectivas margens adjacentes. Todas essas análises foram conduzidas utilizando o *software* R (R Development Core Team, 2019) com os pacotes *caret* (KUNH, 2015) e *FactoMineR* (Husson et al., 2013).

Primeiramente, os espectros obtidos pela análise de CL-EMAR foram convertidos para o formato ABF utilizando o *software* ABFConverter v.4.0. Em seguida, estes foram submetidos a um pré-processamento (detecção dos sinais, alinhamento e deconvolução espectral) no *software* livre MS-DIAL v.3.96 (Riken) (TSUGAWA et al., 2015) para a

realização das análises multivariadas e identificação dos compostos.

Todas as amostras foram submetidas a análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*: PCA) e a análise discriminante de mínimos quadrados parciais (*Partial least squares discriminant analysis*: PLS-DA) a fim de observar inicialmente os perfis de metabólitos discriminantes presentes nos tecidos das lesões e suas respectivas margens adjacentes. Em seguida, o conjunto de dados gerados foi separado em duas categorias: Tumor (T) – incluindo as lesões NIC 2 e NIC 3 e Margem (M) – incluindo as margens adjacentes de NIC 2 e NIC 3.

Posteriormente, a fim de detectar e remover amostras *outliers*, foi utilizada a estratégia de construção de um modelo de Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis*: PCA) no conjunto de dados, para averiguação da distância ortogonal das amostras, onde foram detectadas e removidas 17 amostras do conjunto inicial de dados. Depois, os dados foram pré-processados e normalizados utilizando a seguinte combinação de métodos: BoxCox, centralizados e normalizados (Spiciarich, 2017). A análise discriminante de mínimos quadrados parciais (*Partial least squares discriminant analysis*: PLS-DA) foi realizada para verificar o potencial do uso da espectrometria de massas aplicada às amostras de lesões precursoras do câncer de colo de útero e suas respectivas margens adjacentes para separação destas amostras nos grupos T e M.

A fim de se avaliar a classificação das amostras entre os grupos T e M, baseado na metodologia proposta por Proitsi e colaboradores (2015), foi utilizado uma abordagem com *Random Forest* para a seleção de variáveis importantes e classificação das amostras. Devido ao grande número de variáveis iniciais, a seleção das variáveis mais importantes é fundamental para o bom desempenho de um modelo de classificação. Nesse sentido, para o treino e avaliação dos modelos, os dados foram divididos em dois conjuntos: treinamento (2/3 dos dados iniciais) e avaliação independente (1/3), empregando-se o parâmetro "AUC" para testar o desempenho do classificador. Por fim, após a escolha do melhor modelo, as variáveis mais importantes (VIP) para este classificador foram analisadas por estatística descritiva (*box-plot*) através do método "Mann-Whitney test" para avaliação da diferença significativa ($p < 0,05$) entre as categorias.

Após as análises estatísticas e multivariadas, foi realizada a identificação de alguns metabólitos significantes na separação das classes presentes nas amostras analisadas, utilizando o *software* livre MS-DIAL v3.96 (Riken) (TSUGAWA et al., 2015),

que contém a biblioteca MONA (*Mass Bank of North America*). Foi comparado a fragmentação dos íons alvos (MS2) com as referências contidas nessa biblioteca, levando em consideração um *score* total acima de 700. Além disso, os íons alvos e suas fragmentações foram pesquisados nos bancos de dados HMDB e METLIN através do CEU Mass Mediator 3.0 (GIL-DE-LA-FUENTE et al., 2019).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Características gerais dos indivíduos para o estudo metabolômico

Foram selecionadas 52 pacientes para o estudo metabolômico (Apêndice C). Algumas características das mulheres que participaram da pesquisa relacionadas a fatores de risco para NIC 2 e NIC 3 foram levadas em consideração para a escolha dessas pacientes. A idade média das mulheres selecionadas para o estudo foi de 43 anos. No total, foram obtidas 13 amostras de tecidos com NIC 2 e 39 amostras de tecidos com NIC 3; sendo que para todas as amostras de lesão também foi analisado as respectivas margens adjacentes (Gráfico 9).

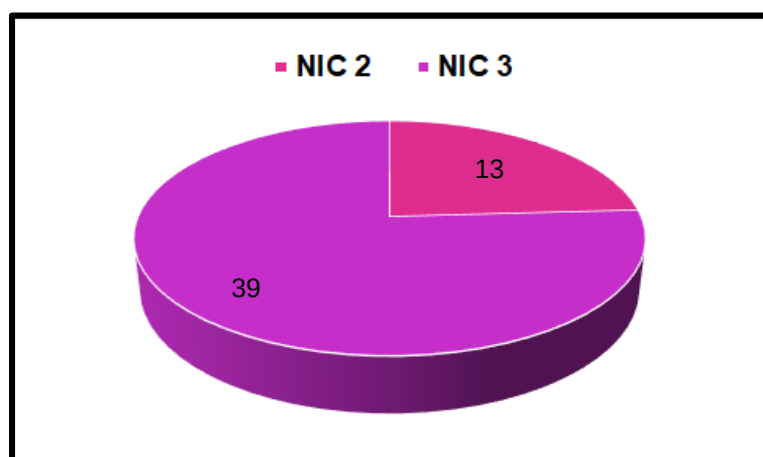


Gráfico 9 - Distribuição das mulheres selecionadas para o estudo metabolômico de acordo com o tipo de lesão.

Com relação ao perfil socioeconômico (Tabela 11) das mulheres, observou-se que grande parte das mulheres afirmaram ser casadas (38,46%). Quanto a escolaridade, 23,08% possuem o ensino fundamental incompleto. Além disso, cerca de 67,31% possui renda de até 1 salário mínimo. Este fato é similar com as mulheres presentes no estudo proteômico, no qual a grande maioria possui baixa escolaridade e baixa renda.

Tabela 11 – Perfil socioeconômico das mulheres envolvidas no estudo metabólico.

Variáveis	F	f (%)
<i>Estado civil</i>		
Casada	20	38.46%
Divorciada	4	7.69%
Solteira	14	26.92%
União estável	11	21.15%
Viúva	3	5.77%
<i>Escolaridade</i>		
Analfabeto	6	11.54%
Ensino Fundamental Completo	9	17.31%
Ensino Fundamental Incompleto	12	23.08%
Ensino Médio Completo	11	21.15%
Ensino Médio Incompleto	3	5.77%
Superior Completo	5	9.62%
Superior Incompleto	6	11.54%
<i>Renda familiar</i>		
Até 1 salário mínimo	35	67.31%
Até 2 salários mínimos	12	23.08%
Até 3 salários mínimos ou mais	4	7.69%
NR	1	1.92%

f: Frequência; f (%): Frequência Relativa

A Tabela 12 demonstra dados relacionados ao perfil clínico dessas mulheres. Em suma, a média da idade das mulheres relacionada a primeira relação sexual foi de 15 anos (DP± 2,12 anos). Já a idade média da primeira gestação foi de 18 anos (DP± 5,98 anos). Com relação aos partos normais, observou-se uma média de aproximadamente 3 partos (DP± 3,42 anos), sendo vinte o número máximo de partos normais. Pode-se observar que estes dados são semelhantes com o das mulheres do estudo proteômico, onde a maioria delas teve sua primeira relação sexual e gestação precocemente com multiparidade.

Tabela 12 – Perfil clínico das mulheres envolvidas no estudo metabólico (Parte 1).

Variável	Média	Mediana	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo
Idade da 1ª relação sexual	15.481	15.5	2.119	10	20
Idade da 1ª gestação	18.558	17	5.982	0	34
Nº total de abortos	0.769	0	1.078	0	5
Nº de partos normais	3.712	3	3.42	0	20
Nº de partos cesáreos	0.808	1	1.329	0	9

Um fator interessante no estudo metabólico foi o máximo de números de partos normais ser alto. Existem alguns estudos na literatura que apontam a alta paridade como um fator de risco tanto para o câncer cervical quanto para suas lesões precursoras (CASTELLSAGUÉ; BOSCH; MUÑOZ, 2002; MURTA et al., 1999; RAMA et al., 2008). Um exemplo é o trabalho realizado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), onde foram estudadas mulheres gestantes e controles (não gestante) e se verificou que mulheres com sete ou mais gestações apresentaram um risco de desenvolver o câncer de colo de útero quatro vezes maior quando comparadas com as nulíparas; sendo que tal fato também pode estar associado a mecanismos biológicos como aspectos hormonais, traumáticos e imunológicos (CASTELLSAGUÉ; BOSCH; MUÑOZ, 2002).

Adicionalmente, observou-se que 55,77% das mulheres não tinham o hábito de fumar, 57,69% faziam o uso de anticoncepcional, 46,15% tiveram cinco ou mais parceiros sexuais ao longo da vida e ainda, 9,61% apresentaram relatos em seu prontuário relacionado a presença de DSTs, sendo herpes tipo 2 (7,69%) e HPV (1,92%) os dois citados (Tabela 13).

Tabela 13 – Perfil clínico das mulheres envolvidas no estudo metabólico (Parte 2).

Variáveis	F	f (%)
<i>Hábito de fumar</i>		
Não	29	55.77%
Sim	23	44.23%
<i>Uso de anticoncepcional</i>		
Não	22	42.31%
Sim	30	57.69%
<i>Nº de parceiros sexuais</i>		
Um	6	11.54%
Dois	8	15.38%
Três	5	9.62%
Quatro	9	17.31%
Cinco ou mais	24	46.15%
<i>Presença de DST no prontuário</i>		
Não	47	90.38%
Sim, Herpes tipo 2	4	7.69%
Sim, HPV	1	1.92%

f: Frequência; f (%): Frequência relativa

Diferentemente do estudo proteômico, algumas mulheres apresentaram hábito de fumar e também a presença de DST em seu prontuário. Com relação ao tabagismo, há relatos do papel do fumo como fator de risco do câncer cervical, o que pode ser preocupante visto que existem relatos na literatura sobre a tendência de aumento do hábito de fumar em mulheres jovens (PLUMMER et al., 2003). Além disso, a presença de DST é um fator de risco importante, principalmente o HPV, onde há vários relatos de estudos indicando este vírus como fator etiológico para o câncer cervical e suas lesões precursoras (RAMA et al., 2008; ROSA et al., 2009b).

3.4.2 Otimização do preparo de amostras para análise metabolômica

O Gráfico 10 mostra os cromatogramas obtidos referentes as amostras da fase aquosa do teste realizado. Em suma, foi possível verificar que todas as três metodologias não apresentaram cromatogramas com bons resultados. Além disso, as amostras analisadas ficaram bem diluídas, especialmente na metodologia 1 que não apresentou nenhum pico cromatográfico referente à amostra. Isso pode ter ocorrido devido à alta quantidade de volume adicionado na ressuspensão. Sendo assim, todas as amostras foram secas novamente e ressuspensas em 50 μ L, para então serem analisadas novamente.

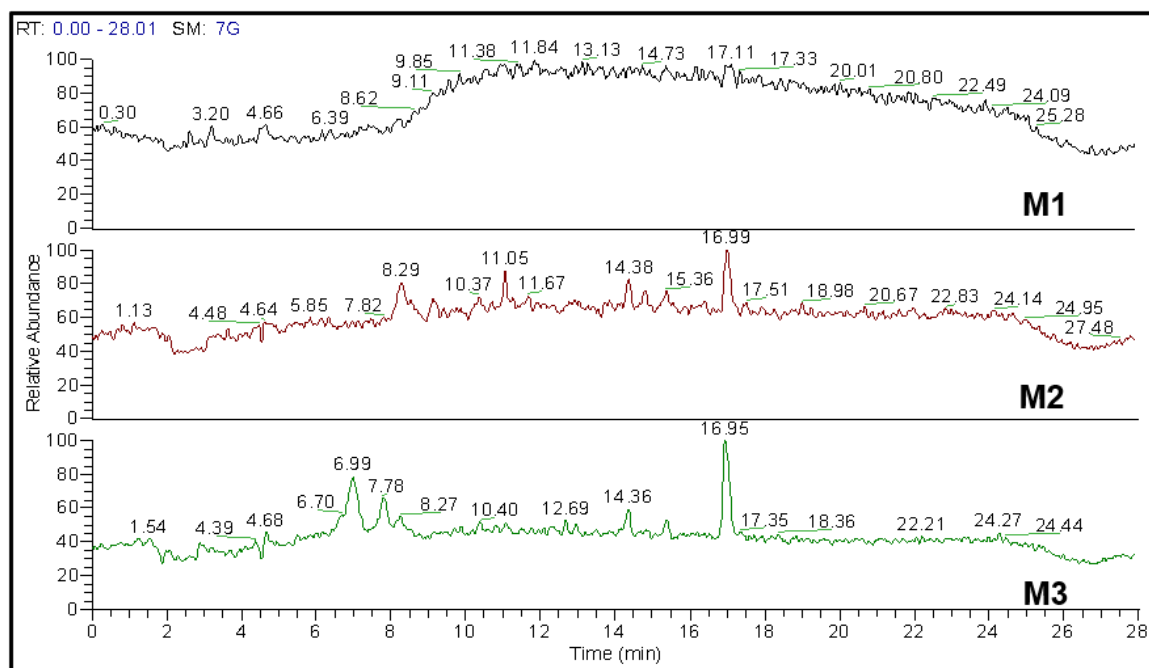


Gráfico 10 - Cromatogramas das amostras relacionados a metodologia 1 (M1), 2 (M2) e 3 (M3) – teste 1.

O Gráfico 11 apresenta os perfis cromatográficos do novo teste realizado. Observa-se que em ambos os testes realizados, os perfis dos cromatogramas mostraram bastante similaridade entre si. Devido a essa característica, foi escolhida a metodologia mais prática de maceração para a realização do preparo das amostras, sendo essa a metodologia 1.

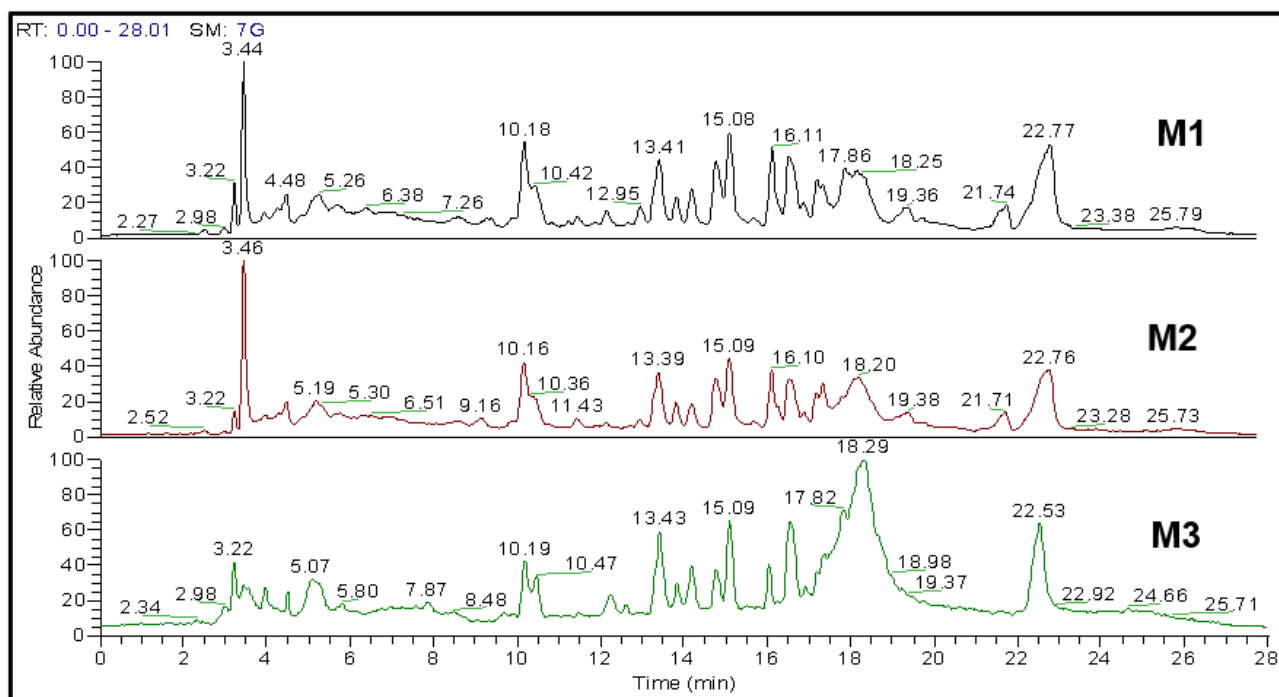


Gráfico 11 - Cromatogramas das amostras relacionados a metodologia 1 (M1), 2 (M2) e 3 (M3) – teste 2.

Com a metodologia definida, foram realizadas as análises para o estudo metabolômico das amostras, obtendo os cromatogramas apresentados no gráfico 12. Neste, é possível observar que há similaridade nos perfis cromatográficos das condições estudadas, sendo verificada apenas uma diferenciação na concentração dos metabólitos.

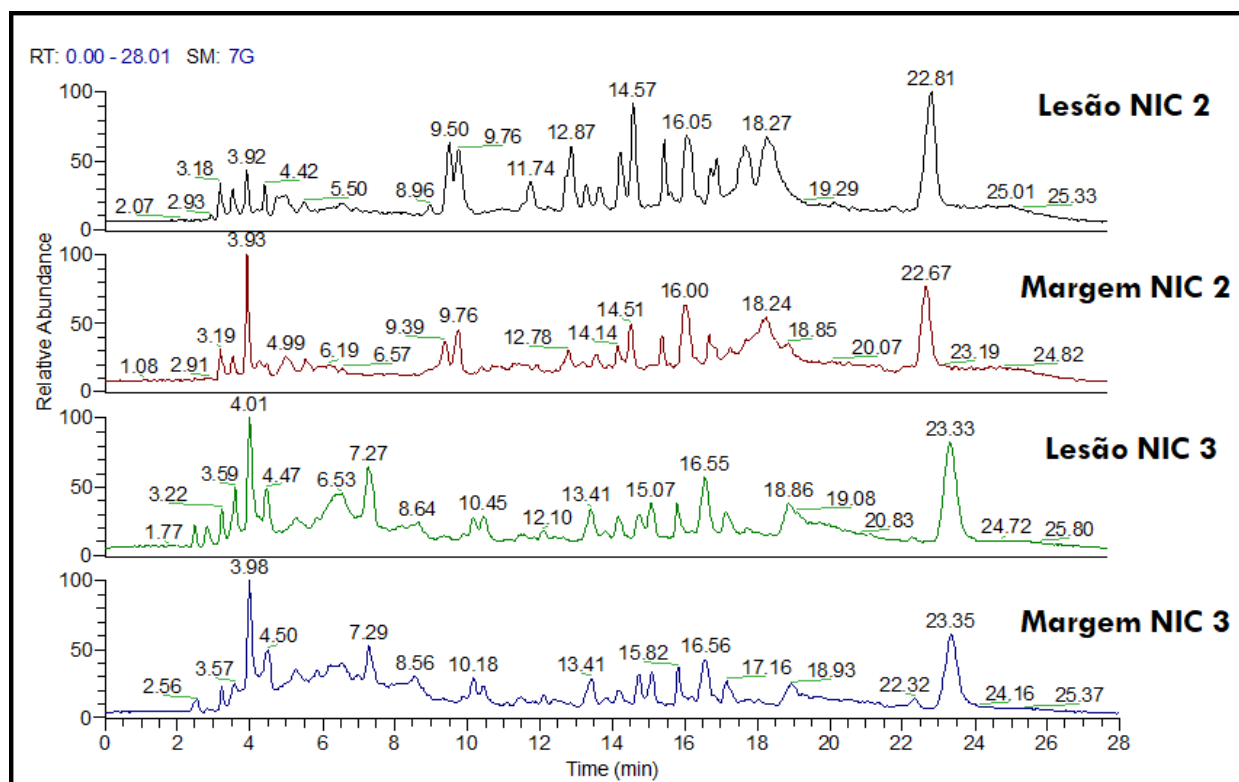


Gráfico 12 – Cromatogramas das amostras do estudo metabolômico.

3.4.3 Estudo metabolômico

Primeiramente, foi realizada a análise multivariada pelo método PCA de todas as amostras obtidas contendo os metabólitos polares, ou seja, das amostras de NIC 2 (margem e lesão) e NIC 3 (margem e lesão), com o intuito de observar as correlações presentes entre os indivíduos. Tais resultados são mostrados no gráfico 13.

Os resultados do PCA demonstraram que as amostras não obtiveram uma boa separação por esse método. Vale frisar que amostras de tecido humano são bastante complexas, tornando difícil a sua separação utilizando um método estatístico não supervisionado.

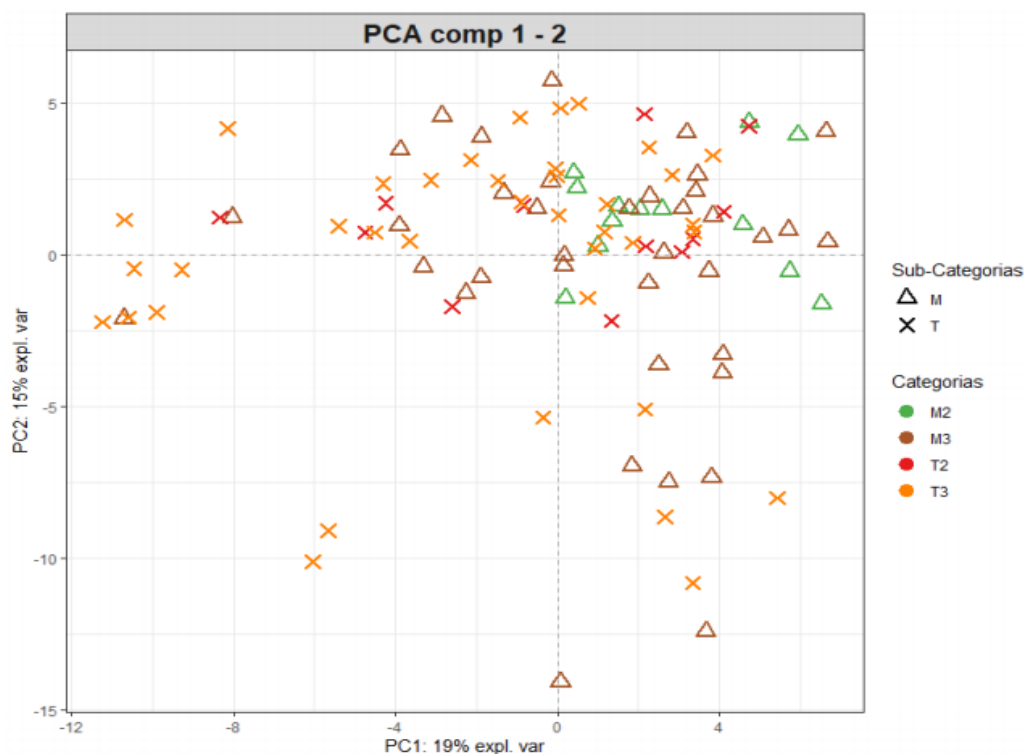


Gráfico 13 - PCA das amostras NIC 2 – margem (verde) e lesão (vermelho), e NIC 3 – margem (marrom) e lesão (laranja).

Portanto, devido a análise pelo método PCA não ter sido bem-sucedida, optou-se pela utilização do método supervisionado PLS-DA. Como já foi relatado anteriormente, esse método consiste em encontrar componentes que sejam capazes de separar as observações desejadas a partir de classes previamente estabelecidas. Os gráficos 14 e 15 demonstram o PLS-DA obtido referente às amostras de NIC 2 (margem e lesão) e NIC 3 (margem e lesão), respectivamente.

A partir do método PLS-DA (Gráficos 14 e 15), verificou-se que houve uma separação significativa entre as amostras de tecido NIC 2 – margem e NIC 3 – lesão. No gráfico 14, é possível notar que a primeira componente separa o grupo das pacientes com lesão de NIC 3 das demais, bem como a segunda componente separa o grupo de pacientes com margem de NIC 2 das demais, destacando-se os agrupamentos bem definidos. Através do gráfico de score em 3D (Gráfico 15), verifica-se que apesar de serem utilizadas 3 variáveis latentes, as amostras se comportam de maneira similar ao gráfico 14 com uma separação nítida entre as amostras de tecido NIC 2 – margem e NIC 3 – lesão.

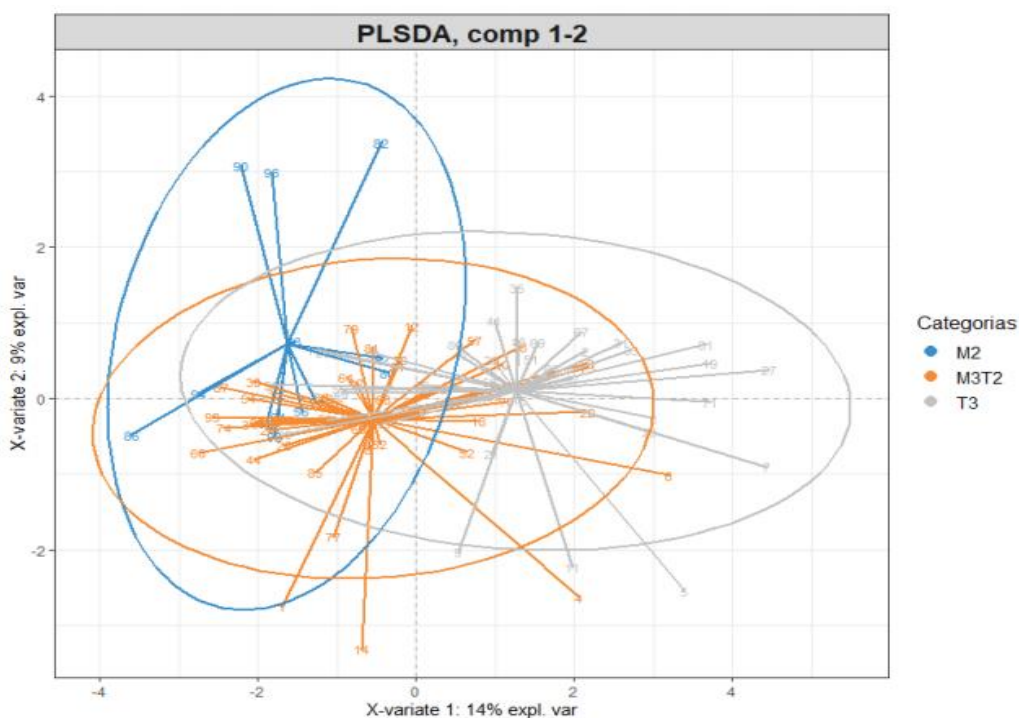


Gráfico 14 - PLS-DA das amostras NIC 2 - margem (azul), NIC 3 - lesão (cinza), NIC 2 – lesão (laranja) e NIC 3 – margem (laranja), apresentando semelhanças entre as amostras de lesão de NIC 2 e a margem adjacente de NIC 3.

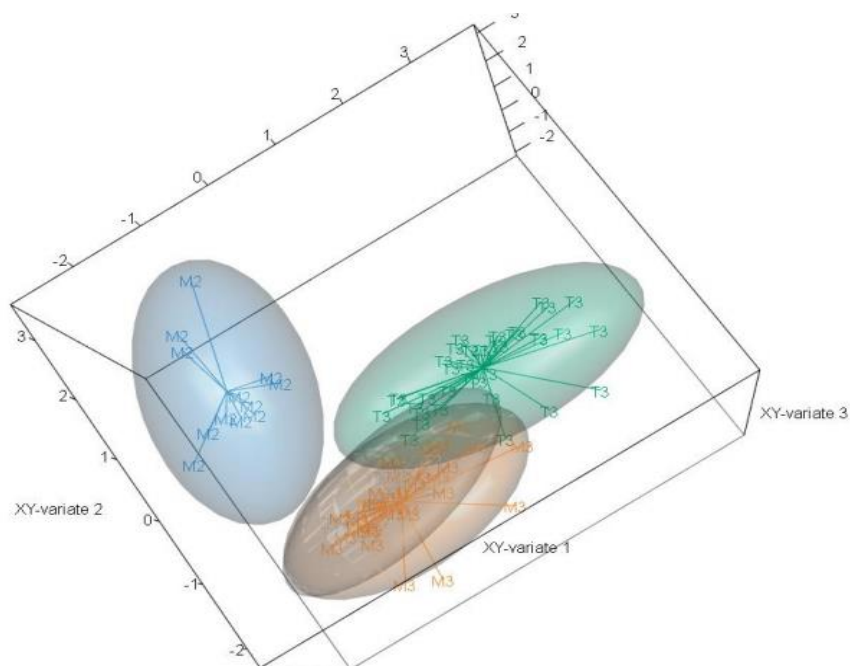


Gráfico 15 - PLS-DA em 3D das amostras NIC 2 - margem (azul), NIC 3 - lesão (verde), NIC 3 – margem (laranja) e NIC 2 – lesão (laranja), apresentando semelhanças entre as amostras de lesão de NIC 2 e a margem adjacente de NIC 3.

Contudo, observa-se que há semelhanças entre as amostras do cerne da lesão de NIC 2 com a margem adjacente de NIC 3 (Gráfico 14 e 15). Apesar de existir a proximidade dos tecidos de amostras de margem com o cerne da lesão, considera-se o fato de que todas as amostras de margens adjacentes desse estudo foram livres de

lesão conforme o laudo histopatológico. Assim, tal fato é bem interessante pois a presença de metabólitos similares em margem de NIC 3 e lesão de NIC2 podem indicar sinais de recorrência ou persistência da lesão. De modo que, uma possível hipótese para isso é que as células presentes na margem adjacente de NIC 3 ainda estejam a caminho para uma alteração celular mais elevada que caracteriza a lesão de NIC 3, podendo assim terem uma característica similar as lesões de NIC 2. Em diversos estudos, a presença de margens cirúrgicas comprometidas é considerada como um dos principais fatores de risco para a recorrência e persistência das NICs (BERTELSEN et al., 1999; FU et al., 2015); contudo, já existem relatos na literatura demonstrando casos de recorrência das NICs em pacientes com margens cirúrgicas livres, mostrando assim que alterações moleculares podem estar ocorrendo (FONSECA; TOMASICH; JUNG, 2011; MALUF; ADAD; MURTA, 2004).

Baseado na influência dos metabólitos presentes nas amostras, o gráfico 16 mostra as variáveis de impacto que colaboram para as divergências encontradas no PLS-DA referente as amostras estudadas. Essas variáveis foram codificadas, onde X_n refere-se ao tempo de retenção das amostras e o símbolo “_n°” refere-se aos valores de razão m/z de cada amostra. Dentre as variáveis de maior impacto para as amostras de margem de NIC 2 tem-se: X4.478_129.06593, X5.964_143.08163, X7.662_152.08109 e X7.379_145.06065. Já com relação as variáveis de impacto para as amostras de lesão de NIC 3 foram: X6.315_113.03501, X17.29_104.10748 e X12.983_142.1591.

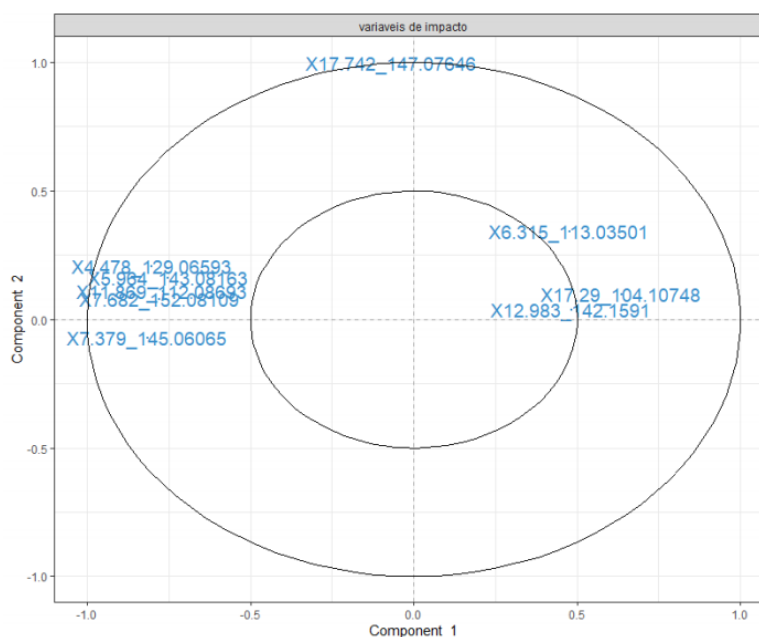


Gráfico 16 - PLS-DA referente as variáveis de impacto presentes nas amostras de T e M.

Após observarmos como todas as amostras se comportavam inicialmente, foi realizado novamente o PCA do conjunto de dados, agora divididos entre duas categorias: Tumor (T) – incluindo lesão de NIC 2 e NIC 3 e Margem adjacente (M) – incluindo margem de NIC 2 e NIC 3, conforme mostra o gráfico 17.

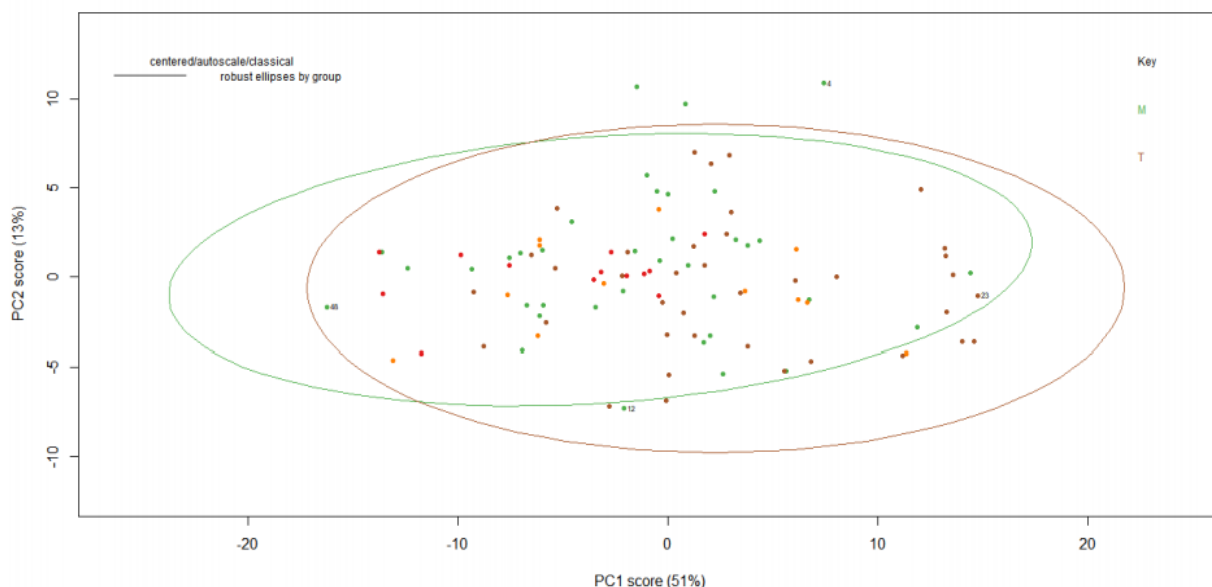


Gráfico 17 - PCA das amostras de lesões NIC 2 e NIC 3 (representados por T) e margens adjacentes à lesão NIC 2 e NIC 3 (representados por M).

Analisando o PCA (Gráfico 17), observa-se que existe a presença de amostras *outliers* que foram extremamente divergentes do conjunto de amostras, de acordo com os testes estatísticos. Assim, foi realizado um procedimento de remoção dessas amostras *outliers* através da distância ortogonal (Gráfico 18), que resultou na remoção de 17 amostras.

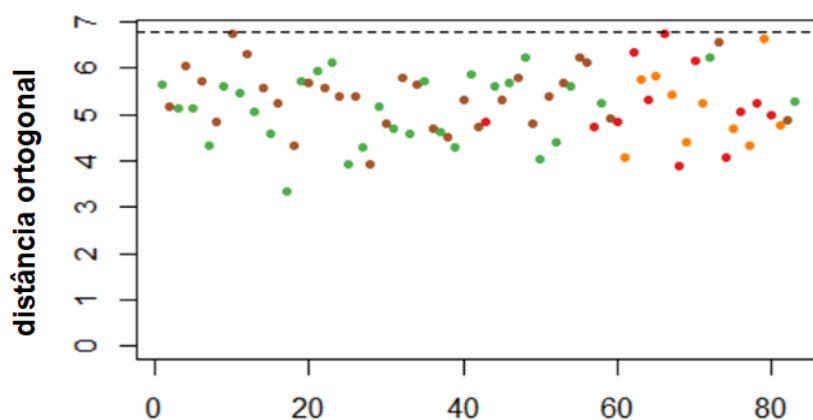


Gráfico 18 - Possíveis outliers baseados na distância ortogonal referentes as amostras de T e M.

Dentre as amostras *outliers* removidas, encontram-se as amostras das pacientes: 1 (T e M), 2 (T e M), 3 (T e M), 4 (T e M), 5 (T e M), 26 (T e M), 30 (somente T), 38 (somente M), 39 (somente T) e 52 (somente M). Assim, para exploração dos dados depois da remoção desses *outliers*, foi utilizado o método PLS-DA (Gráfico 19) para análise de separação e classificação das amostras resultantes.

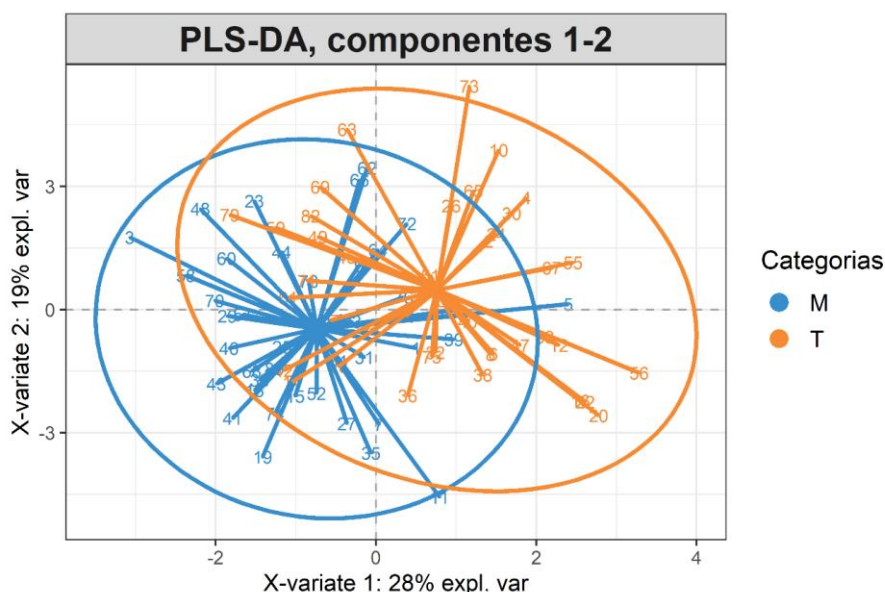


Gráfico 19 - PLS-DA das amostras das lesões NIC 2 e NIC 3 (T – em laranja) e margens adjacentes NIC 2 e NIC 3 (M – em azul), após remoção dos *outliers*.

A partir do PLS-DA acima (Gráfico 19), foi possível verificar uma separação nítida dos centroides dos dois grupos. Apesar de uma pequena sobreposição entre as amostras, observa-se a separação dos grupos de lesões e margens adjacentes através da componente 1 (28%), na qual distinguiu a categoria T no lado positivo e a categoria M no lado negativo. Além disso, nota-se também a separação na componente 2 (19%), onde o grupo referente às lesões (T) apresenta-se na porção positiva, enquanto o grupo referente às margens (M) encontra-se na porção negativa.

Em adição, ao se analisar o gráfico de *scores* 3D (3 componentes), verifica-se nitidamente uma boa separação entre os grupos T e M (Gráfico 20). Esses resultados indicam que a partir de três variáveis latentes (conhecida também como componentes principais), pode-se obter um bom classificador das amostras estudadas pelo método PLS-DA.

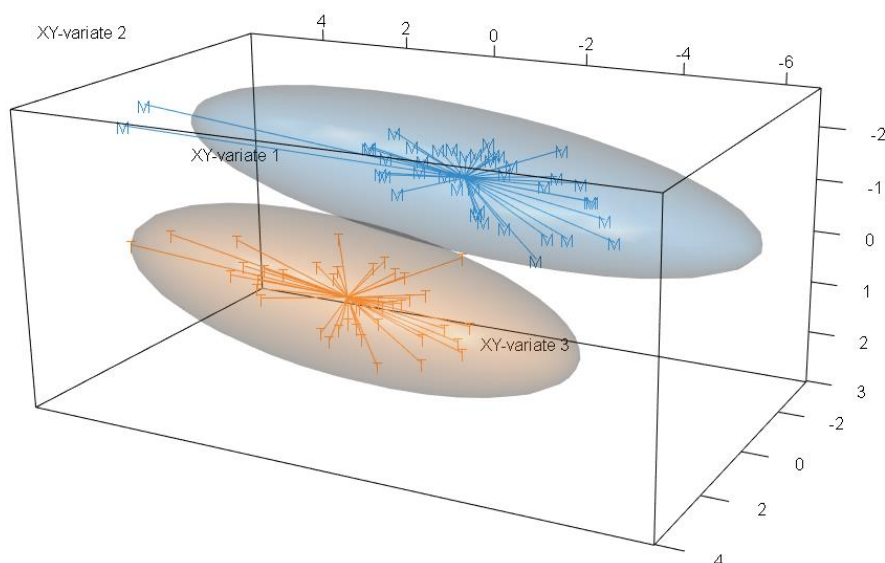


Gráfico 20 - PLS-DA em 3D das amostras de lesões NIC2/NIC3 (T – em laranja) e margens adjacentes de NIC 2/NIC 3 (M – em azul).

Partindo desses resultados obtidos, as variáveis relacionadas com os componentes foram analisadas com relação à sua variação de intensidade entre as categorias. O gráfico 21 mostra as variáveis de maior relação com a componente 1 e 2. Cada variável representa um metabólito. Estes foram codificados, onde “Xn°” refere-se ao tempo de retenção e “xn°” aos valores de m/z desse metabólito. Dentre os metabólitos de maior impacto na componente 1 destaca-se o X14.263x114.12781 na categoria T e X11.869x112.08693 na categoria M. Já na componente 2, destaca-se o metabólito X18.647x112.08692 na categoria M e o metabólito X18.647x104.10749 na categoria T, onde se pode notar a existência de outros metabólitos significativos para a distinção das amostras de lesões e margens adjacentes.

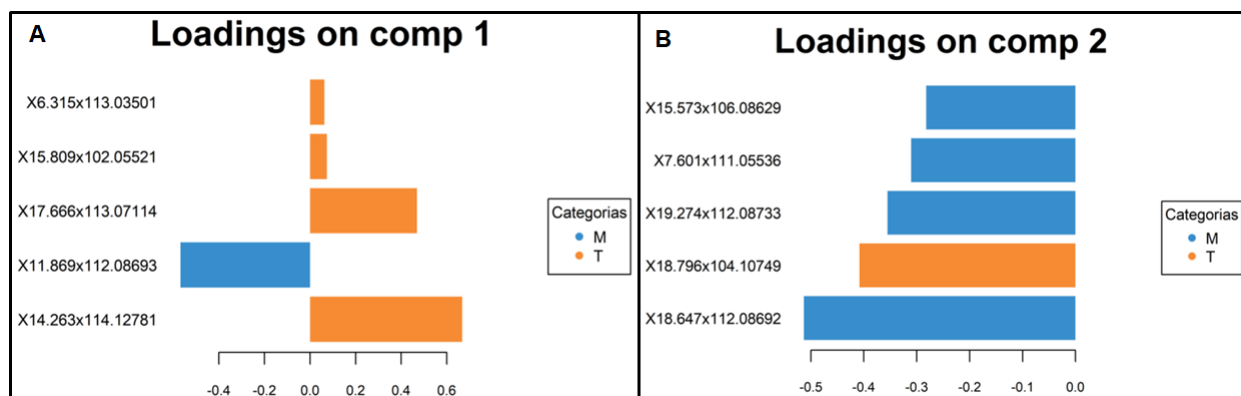


Gráfico 21 - Loadings referentes às variáveis de maior relação com a componente 1 (em A) e a componente 2 (em B).

Através destes metabólitos de maior impacto, foi possível analisar como eles variam com relação aos grupos analisados bem como averiguar se existe diferença estatística significativa entre os valores. Com o intuito de avaliar a classificação das amostras entre os grupos T e M, utilizou-se a abordagem de *Random Forest* (RF*) baseada na metodologia proposta por (PROITS et al., 2015), cuja função foi a seleção de variáveis importantes e classificação das amostras. Como já relatado anteriormente, a seleção das variáveis mais importantes é fundamental para um bom desempenho de um modelo de classificação.

O gráfico 22 mostra as variáveis mais importantes através da modelagem do classificador RF* que demonstrou uma boa acurácia de 81%, tornando possível selecionar os metabólitos, representados por essas variáveis, mais importantes para o modelo, destacando-se as variáveis de 11.869 min e 112.08693 *m/z* (X11.869x112.08693), 17.29 min e 104.10748 *m/z* (X17.29x104.10748) e 18.796 min e 104.10749 *m/z* (X18.796x104.10749).

Random Forest - Variable Importance

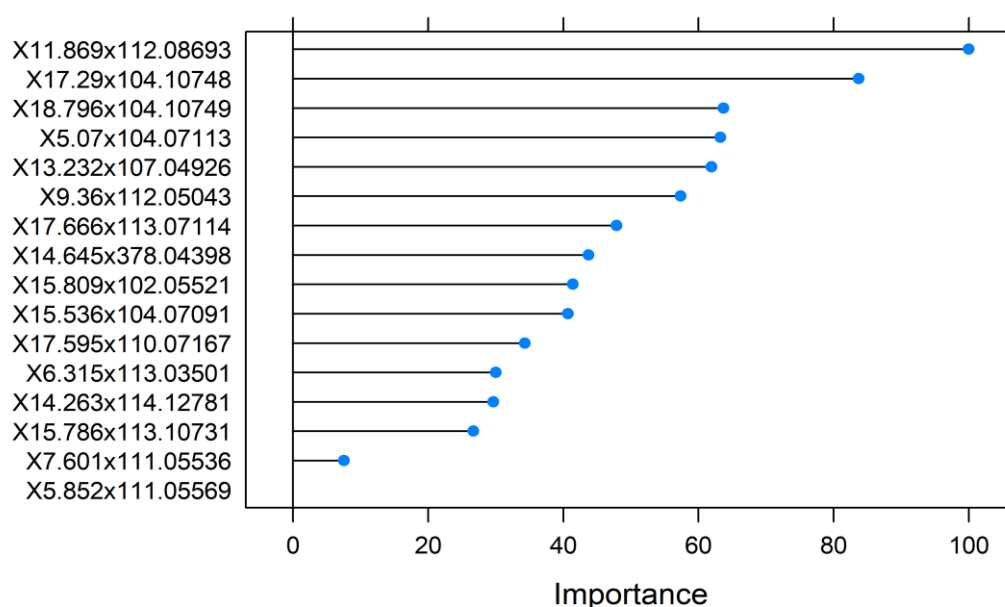


Gráfico 22 - Classificação das amostras por *Random Forest* através das variáveis mais importantes para o modelo.

Nesse contexto, realizou-se outra análise dos valores destas variáveis (RF*) a fim de averiguar a diferença de valores entre os grupos. Nestas, foi possível verificar que existe uma diferença significativa entre os valores das variáveis representadas ($p < 0,05$), onde o grupo T apresenta valores de intensidade relativamente maiores que M (Gráfico 23 e 24). Como cada variável representa um metabólito, neste caso é possível observar

que estes metabólitos possuem expressões alteradas, sendo aumentadas nas amostras de pacientes com lesões de NIC 2/NIC 3 (representadas por T) e diminuídas nas amostras de margens adjacentes NIC 2/NIC 3 (representadas por M). Com isso, pode-se afirmar que esses metabólitos se apresentam como potenciais alvos de discriminação das lesões de alto grau.

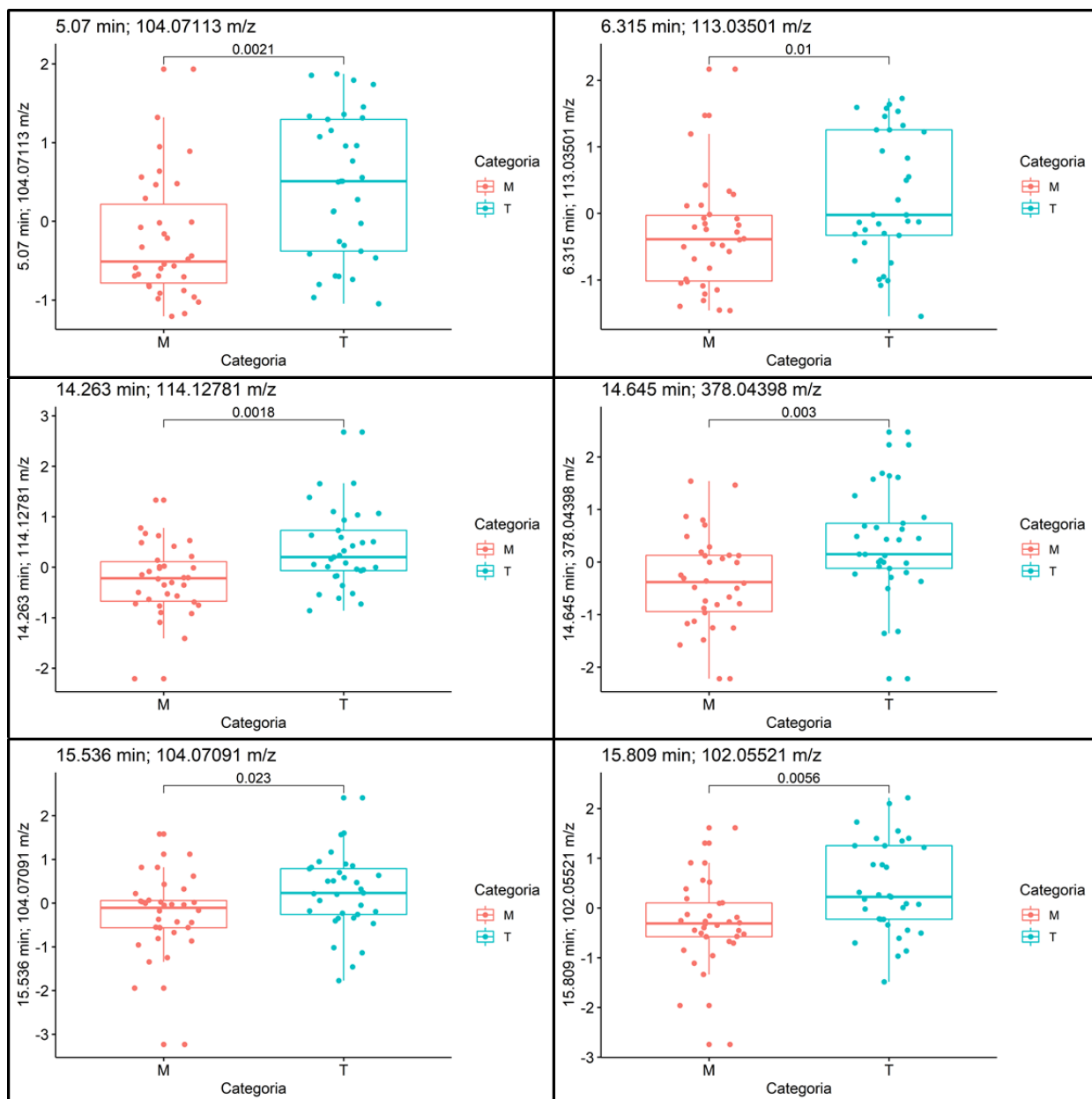


Gráfico 23 - Diferença significativa das variáveis do modelo *Random Forest* com o grupo T (lesões NIC 2 e NIC 3) sendo superior ao grupo M (margens NIC 2 e NIC 3) ($p < 0,05$) (Parte 1).

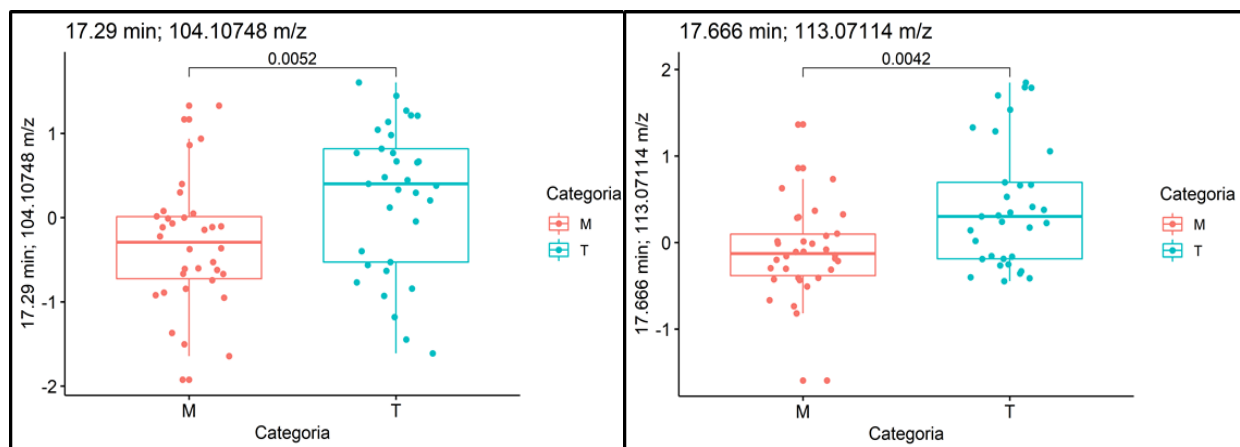


Gráfico 24 - Diferença significativa das variáveis do modelo *Random Forest* com o grupo T (lesões NIC 2 e NIC 3) sendo superior ao grupo M (margens NIC 2 e NIC 3) ($p < 0,05$) (Parte 2).

Já no gráfico 25, foi possível verificar também que há diferença significativa entre os grupos T (lesões de NIC 2 e NIC 3) e M (margens adjacentes à lesão NIC 2 e NIC 3); contudo, nesse caso os valores contidos em M são superiores aos do grupo T. Assim, observa-se que esse metabólito é altamente expresso nas amostras de margens adjacentes à lesão e, conseqüentemente, apresenta baixa expressão nas amostras de lesões de NIC 2/ NIC 3, indicando potencial alvo de discriminação das margens adjacentes.

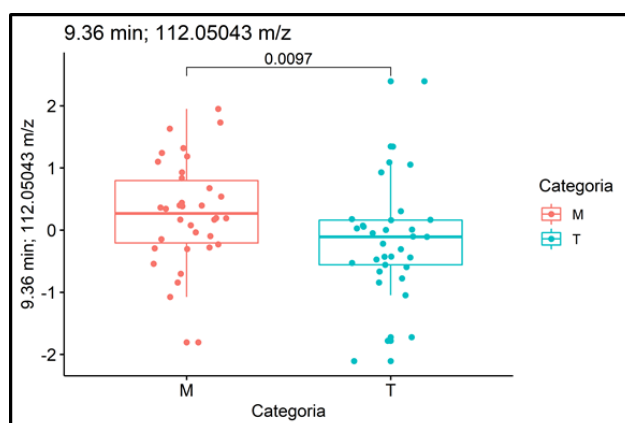


Gráfico 25 - Diferença significativa da variável do modelo *Random Forest* com o grupo M (margens NIC 2 e NIC 3) sendo superior ao grupo T (lesões NIC 2 e NIC 3) ($p < 0,05$).

Além disso, dentre as variáveis mais importantes contidas na modelagem do classificador RF* (Gráfico 22), tem-se a variável de 11.869 min e 112.08693 m/z (X11.869x112.08693), a qual foi possível inferir o composto referente a mesma, a partir

da identificação pelo *software* MS-DIAL v.3.96, utilizando a biblioteca MONA. Vale ressaltar que a identificação dos outros metabólitos está em andamento.

No gráfico 26, tem-se os fragmentos contidos nos espectros de MS/MS experimental (em preto) em comparação ao espectro de MS/MS presente na literatura (em vermelho). Estes são bastante similares, com um *score* total significativo de 904,41 sendo o composto determinado como a histamina.

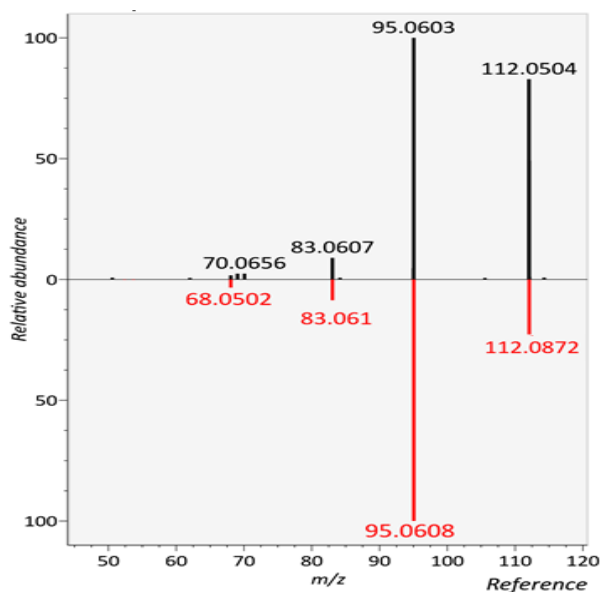


Gráfico 26 - Espectros de MS2 da histamina. Em preto, o espectro MS2 experimental com *m/z* de 112.08694. Em vermelho, o espectro de MS2 do banco de dados MONA utilizando o *software* livre MS-DIAL.

Ao analisar detalhadamente o espectro de MS2 do íon 112,05 obtido a partir das análises desse estudo por CL-EMAR (Gráfico 27), observa-se uma perda inicial de 17Da, o que é coerente com a estrutura -NH₃ e, por conseguinte, há perda de 29Da. Assim, foi possível demonstrar a fragmentação da histamina. É importante frisar ainda que, a identificação do composto com relação a cada fragmentação foi obtida consultando o banco de dados HMDB, disponível em <http://www.hmdb.ca/spectra/ms_ms/1223>.

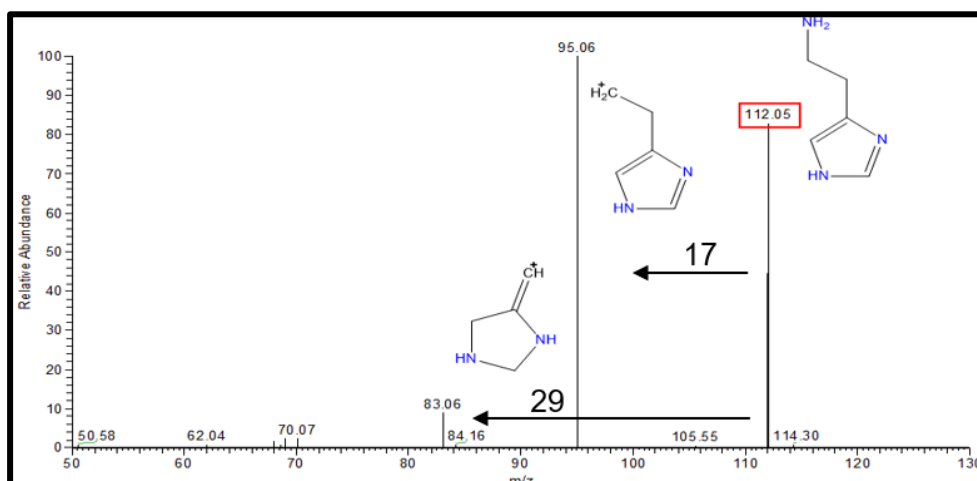


Gráfico 27 - Espectro de massas em MS2 do íon de 112,05 m/z ($[M+H]^+$).

Foi realizado também uma análise referente à histamina para verificar sua diferença entre os grupos T e M (Gráfico 28). Essa análise demonstrou que essa variável possui diferença significativa e está superior nas amostras de margens adjacentes NIC 2/NIC 3 quando comparado ao grupo de lesões NIC 3/NIC 2 ($p < 0,05$).

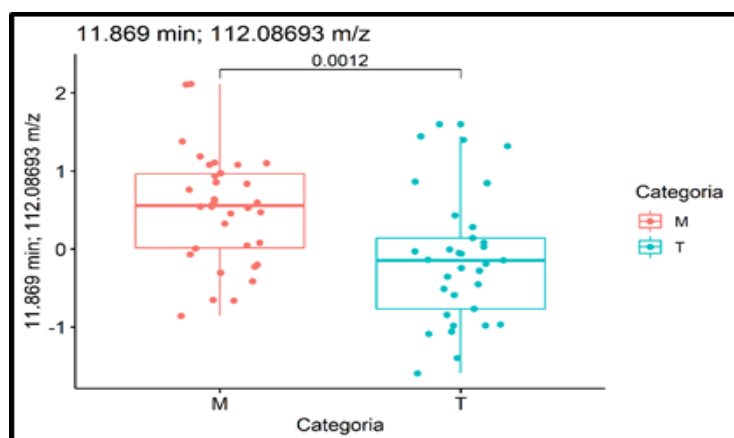


Gráfico 28 - Diferença significativa da variável X11.869x112.08693 no modelo *Random Forest* com o grupo M (margens NIC 2 e NIC 3) sendo superior ao grupo T (lesões NIC 2 e NIC 3) ($p < 0,05$).

A histamina é uma amina clássica de baixo peso molecular, a qual é sintetizada através da L-histidina pela histidina descarboxilase, sendo que os receptores específicos da histamina são fundamentais para as suas devidas funções (YAMADA; TANIMOTO; SASAGURI, 2016). Essa amina já foi isolada em diversos tipos de tecidos, incluindo o tecido periférico onde a histamina é armazenada nos mastócitos, estando também

presente no útero (SZELAG; MERWID-LAD; TROCHA, 2002).

Com relação as células neoplásicas, já foi sugerido que a histamina tenha envolvimento na regulação do crescimento do câncer, devido o maior número de mastócitos encontrados nas proximidades tumorais (CABANILLAS-SAEZ et al., 2002). Além disso, existem relatos na literatura associando a presença desse metabólito em diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de mama (MEDINA et al., 2008), colorretal (BOER et al., 2008), pâncreas (FRANCIS et al., 2013) e ovário (FONG; MCDUNN; KAKAR, 2011).

Contudo, as evidências sobre a atuação da histamina no câncer do colo do útero e suas respectivas lesões precursoras são bastante escassas. No presente estudo, observou-se que os níveis de histamina estão mais elevados nas amostras de margem adjacente quando comparadas as lesões precursoras de alto grau do CCU. Estudos relatam que as células do carcinoma cervical escamoso são resistentes à ação citolítica quando a histamina está combinada com o fator de necrose tumoral- α , cujo papel é importante no decorrer da resposta inflamatória bem como nos mecanismos de defesa antiviral (DIACONU et al., 2008; MOCELLIN et al., 2005).

Por fim, diante dos resultados obtidos neste estudo para análise do perfil metabolômico, foi possível mostrar uma diferença significativa de metabólitos presentes nas amostras de tecido com as lesões de NIC 2 e NIC 3, bem como suas margens adjacentes. Apesar de não ter sido possível identificar todas as variáveis referentes aos metabólitos significativos até o momento, a identificação da histamina com níveis mais elevados nas margens de NIC 2/NIC 3 chama a atenção para a possibilidade da presença de outros metabólitos associados ao desenvolvimento das lesões NIC 2/NIC 3 ou até mesmo o câncer cervical nesses tecidos; visto que já existem relatos na literatura de que as próprias células cancerígenas são capazes de produzir a histamina para sua sobrevivência e propagação (GRAFF et al., 2002; HAAK-FRENDTSCHO et al., 2000).

Capítulo IV

Considerações Finais

A análise dos perfis proteicos e metabólicos das amostras de tecidos com lesões precursoras do câncer de colo de útero e suas respectivas margens adjacentes apresentaram dados relevantes em cada abordagem empregada.

Com relação a análise proteômica, foi possível identificar proteínas unicamente presentes nas amostras de lesões de alto grau e suas respectivas margens adjacentes analisadas. Nas lesões de NIC 3 e NIC 2, notou-se a presença de proteínas associadas a proliferação celular como por exemplo: a caderina-13 e a apolipoproteína A-I e, em suas respectivas margens adjacentes destacaram-se proteínas envolvidas na regulação biológica, como por exemplo: a histona H1 e a histona H4. Quando comparadas as lesões de NIC 2 e de NIC 3 foram identificadas 783 proteínas, tendo uma maior quantidade de proteínas únicas presentes em NIC 2. Isso ocorreu também quando se comparou as margens adjacentes das respectivas lesões mencionadas, onde foram identificadas no total 413 proteínas, tendo mais proteínas únicas nas margens adjacentes de NIC 2. Tal fato pode estar correlacionado com a progressão dessas lesões, visto que muitas das proteínas identificadas atuam no desenvolvimento cancerígeno.

Além disso, houve a identificação de algumas proteínas diferencialmente abundantes entre os tecidos com lesões de NIC 2 e de NIC 3, bem como entre suas respectivas margens adjacentes. Sugerindo assim, que estas possam estar associadas a processos moleculares específicos em tais condições como o crescimento e invasão de células alteradas; logo, poderiam ser alvos em futuros trabalhos para a identificação de biomarcadores para as lesões precursoras do câncer de colo de útero.

Já na metabolômica utilizando as análises estatísticas, verificou-se também a diferenciação do perfil de metabólitos presentes em ambos os grupos de amostras analisadas. Observou-se que a lesão de NIC 3 e a margem adjacente de NIC 2 apresentam metabólitos diferenciais; contudo, ao se analisar a lesão de NIC 2 com a margem adjacente de NIC 3, notou-se semelhança entre os perfis de metabólitos. Esse fato pode estar relacionado a recorrência e/ou persistência dessas lesões, demonstrando indícios de que apesar da margem adjacente estar livre de células cancerígenas, já há alterações metabólicas importantes ocorrendo nessas regiões.

Adicionalmente, ao comparar as amostras de tecidos de lesões NIC 2/NIC 3 com margens adjacentes NIC 2/NIC 3, observou-se uma diferenciação significativa nos perfis de metabólitos presentes entre essas duas categorias, apresentando a existência de metabólitos significativos para a distinção das amostras de lesões de alto grau e

margens adjacentes. Além disso, a partir do modelo preditivo, foi possível obter esses resultados com uma acurácia maior que 80% utilizando a validação externa; sendo este um bom resultado considerando ser um trabalho de classificação de tais lesões. E ainda, através dos dados obtidos, foi possível a identificação da histamina mais abundante nas margens adjacentes; o que chama a atenção uma vez que esta amina está ligada a processos cancerígenos e pode ter relação com uma possível evolução dessas lesões.

Portanto, os resultados apresentados nesse trabalho demonstram características interessantes que podem ajudar a melhorar nosso entendimento da evolução das NICs, bem como indicar um possível potencial da espectrometria de massas utilizando as abordagens proteômica e metabolômica na diferenciação do tecido com as lesões precursoras do câncer de colo de útero, bem como suas respectivas margens adjacentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABID, F. et al. Chapter 3 - Omics Approaches in Marine Biotechnology: The Treasure of Ocean for Human Betterments. In: BARH, D.; AZEVEDO, V. (Eds.). **Omics Technologies and Bio-Engineering**. Academic Press, 2018. p. 47–61.
- ABIKE, F. et al. Human papilloma virus persistence and neopterin, folate and homocysteine levels in cervical dysplasias. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 284, n. 1, p. 209–214, 1 jul. 2011.
- ALBERICE, Juliana Vieira. **Avaliação analítica de potenciais biomarcadores para câncer de bexiga em urina**. 2014. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.
- ALKEMADE, H. A. C. et al. Levels of Skin-Derived Antileukoproteinase (SKALP)/Elafin in Serum Correlate with Disease Activity During Treatment of Severe Psoriasis with Cyclosporin A. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 104, n. 2, p. 189–193, 1 fev. 1995.
- ALKHATEEB, A. A.; CONNOR, J. R. The significance of ferritin in cancer: Anti-oxidation, inflammation and tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1836, n. 2, p. 245–254, 1 dez. 2013.
- ALMEIDA, F. G. O. et al. Proteomic assessment of colorectal cancers and respective resection margins from patients of the Amazon state of Brazil. **Journal of Proteomics**, v. 154, p. 59–68, 10 fev. 2017.
- ALMEIDA, Fabiana Greyce Oliveira. **Análise proteômica e epigenética de pacientes com câncer colorretal do estado do Amazonas**. 2017. 152 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.
- ALONSO, A.; MARSAL, S.; JULIÀ, A. Analytical Methods in Untargeted Metabolomics: State of the Art in 2015. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, 2015.
- AQUINO, Priscila Ferreira de. **Prospecção de candidatos a biomarcadores oncológicos de cânceres gástricos por espectrometria de massas**. 2012. 175f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.
- AQUINO, P. F. et al. Exploring the Proteomic Landscape of a Gastric Cancer Biopsy with the Shotgun Imaging Analyzer. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 1, p. 314–320, 3 jan. 2014.
- AQUINO, P. F. D. **Avaliação proteômica da margem de ressecção de pacientes com câncer gástrico por espectrometria de massas**. 2015. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.
- AROSIO, P.; INGRASSIA, R.; CAVADINI, P. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 7, p. 589–599, jul. 2009.

ARTERO-CASTRO, A. et al. Expression of the ribosomal proteins Rplp0, Rplp1, and Rplp2 in gynecologic tumors. **Human Pathology**, v. 42, n. 2, p. 194–203, 1 fev. 2011.

ASKEW, Y. S. et al. SERPINB12 is a novel member of the human ov-serpin family that is widely expressed and inhibits trypsin-like serine proteinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 52, p. 49320–49330, 28 dez. 2001.

AUDIE, J.-P. et al. Mucin gene expression in the human endocervix. **Human Reproduction**, v. 10, n. 1, p. 98–102, 1 jan. 1995.

BAHADO-SINGH, R. O. et al. Metabolomic prediction of endometrial cancer. **Metabolomics**, v. 14, n. 1, p. 6, 1 dez. 2017.

BANACH, P. et al. Mass spectrometry as a tool for biomarkers searching in gynecological oncology. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 92, p. 836–842, ago. 2017.

BARBA DE LA ROSA, A. P. et al. Analysis of human serum from women affected by cervical lesions. **Journal of Experimental Therapeutics & Oncology**, v. 7, n. 1, p. 65–72, 2008.

BARBOSA, E. B. et al. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366–375, maio 2012.

BARH, D.; BLUM, K.; MADIGAN, M. A. **OMICS: Biomedical Perspectives and Applications**. CRC Press, 2016.

BARNABAS, G. D. et al. Microvesicle Proteomic Profiling of Uterine Liquid Biopsy for Ovarian Cancer Early Detection. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 18, n. 5, p. 865–875, 1 maio 2019.

BARREIRO-ALONSO, A. et al. Delineating the HMGB1 and HMGB2 interactome in prostate and ovary epithelial cells and its relationship with cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 27, p. 19050–19064, 10 abr. 2018.

BARUTO, J. et al. Imunologia Básica para o Clínico. In: VOLTARELLI, J.C.; et al. (org.) **Imunologia clínica na prática**. São Paulo: Atheneu, 2009

BEGER, R. D. A Review of Applications of Metabolomics in Cancer. **Metabolites**, v. 3, n. 3, p. 552–574, 5 jul. 2013.

BERRY, D. C.; NOY, N. Retinol Binding Protein 4: Role in Diabetes and Cancer. In: REIZES, O.; BERGER, N. A. (Eds.). **Adipocytokines, Energy Balance, and Cancer**. Balanço de Energia e Câncer. Cham: Springer International Publishing, p. 89–107, 2017.

BERTELSEN, B. et al. Laser conization of cervical intraepithelial neoplasia grade 3: free resection margins indicative of lesion-free survival. **Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica**, v. 78, n. 1, p. 54–59, jan. 1999.

BERTOLI, S. et al. Ferritin heavy/light chain (FTH1/FTL) expression, serum ferritin levels, and their functional as well as prognostic roles in acute myeloid leukemia. **European Journal of Haematology**, v. 102, n. 2, p. 131–142, 1 fev. 2019.

BICKEBÖLLER, M. et al. Functional characterization of the tumor-suppressor MARCKS in colorectal cancer and its association with survival. **Oncogene**, v. 34, n. 9, p. 1150–1159, 26 fev. 2015.

BLACKSHEAR, P. J. The MARCKS family of cellular protein kinase C substrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 3, p. 1501–1504, 25 jan. 1993.

BLOEMINK, M. J.; GEEVES, M. A. Shaking the myosin family tree: Biochemical kinetics defines four types of myosin motor. **Seminars in Cell & Developmental Biology, Mechanochemical Cell Biology**, v. 22, n. 9, p. 961–967, 1 dez. 2011.

BOCCARD, J.; VEUTHEY, J.-L.; RUDAZ, S. Knowledge discovery in metabolomics: an overview of MS data handling. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 3, p. 290–304, fev. 2010.

BOER, K. et al. Decreased expression of histamine H1 and H4 receptors suggests disturbance of local regulation in human colorectal tumours by histamine. **European Journal of Cell Biology**, v. 87, n. 4, p. 227–236, abr. 2008.

BOICHENKO, A. P. et al. A Panel of Regulated Proteins in Serum from Patients with Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Cancer. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 11, p. 4995–5007, 7 nov. 2014.

BOLIGNANO, D. et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage. **American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation**, v. 52, n. 3, p. 595–605, set. 2008.

BOND, L. M. et al. Small-molecule inhibitors of myosin proteins. **Future Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 41–52, 20 dez. 2012.

BRAGA, M. S. et al. Shotgun proteomics to unravel the complexity of the Leishmania infantum exoproteome and the relative abundance of its constituents. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 1, p. 43–53, jun. 2014.

BRAIDOTTI, P. et al. DMBT1 expression is down-regulated in breast cancer. **BMC Cancer**, v. 4, n. 1, p. 46, 9 ago. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Normas e Procedimentos para Vacinação**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, p. 178, 2014.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BRUNI, L. et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 12, p. 1789–1799, 15 dez. 2010.

BUISINE, M. P. et al. Developmental mucin gene expression in the human respiratory tract. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 20, n. 2, p. 209–218, fev. 1999.

BYRNE, J. A. et al. Tumor protein D52 (TPD52) is overexpressed and a gene amplification target in ovarian cancer. **International Journal of Cancer**, v. 117, n. 6, p. 1049–1054, 20 dez. 2005.

BYRNE, J. A. et al. MAL2 and tumor protein D52 (TPD52) are frequently overexpressed in ovarian carcinoma, but differentially associated with histological subtype and patient outcome. **BMC Cancer**, v. 10, n. 1, p. 497, 17 set. 2010.

BYRNE, J. A. et al. Tumor protein D52 (TPD52) and cancer—oncogene understudy or understudied oncogene? **Tumor Biology**, v. 35, n. 8, p. 7369–7382, 1 ago. 2014.

CABANILLAS-SAEZ, A. et al. Characterization of mast cells according to their content of tryptase and chymase in normal and neoplastic human uterine cervix. **International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society**, v. 12, n. 1, p. 92–98, fev. 2002.

CAIXETA, Rodrigo Cesar Assis. **Associação entre Papilomavírus Humano, Vaginose Bacteriana e Inflamação Cervical e a detecção de anormalidades no exame citológico de adolescentes e mulheres jovens**. 2014. 82 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

CANALES, N. A. G. et al. A1BG and C3 are overexpressed in patients with cervical intraepithelial neoplasia III. **Oncology Letters**, v. 8, n. 2, p. 939–947, ago. 2014.

CANDIDO, S. et al. Roles of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 6, p. 1576–1594, 1 fev. 2014.

CANTÚ, M. D. et al. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669–675, 2008.

CANUTO, G. et al. METABOLÔMICA: DEFINIÇÕES, ESTADO-DA-ARTE E APLICAÇÕES REPRESENTATIVAS. **Química Nova**, 1 jan. 2018.

CAO, W. et al. Discovery of plasma messenger RNA as novel biomarker for gastric cancer identified through bioinformatics analysis and clinical validation. **PeerJ**, v. 7, 18 jun. 2019.

CARREGARO, F. et al. Study of small proline-rich proteins (SPRRs) in health and disease: a review of the literature. **Archives of Dermatological Research**, v. 305, n. 10, p. 857–866, 1 dez. 2013.

CARVALHO, M. C. DE M. P.; QUEIROZ, A. B. A. Lesões precursoras do câncer cervicouterino: evolução histórica e subsídios para consulta de enfermagem

ginecológica. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 14, n. 3, p. 617–624, 2010.

CARVALHO, P. C. et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nature Protocols**, v. 11, n. 1, p. 102–117, jan. 2016.

CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. **Virus Research**, v. 89, n. 2, p. 191–199, nov. 2002.

CHAN, T.-F. et al. Natural variation in four human collagen genes across an ethnically diverse population. **Genomics**, v. 91, n. 4, p. 307–314, abr. 2008.

CHASSAGNE, F. et al. A metabolomic approach to identify anti-hepatocarcinogenic compounds from plants used traditionally in the treatment of liver diseases. **Fitoterapia**, 2018.

CHELIMO, C. et al. Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. **The Journal of Infection**, v. 66, n. 3, p. 207–217, mar. 2013.

CHEN, P.; CESCION, M.; BONALDO, P. Collagen VI in cancer and its biological mechanisms. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 7, p. 410–417, jul. 2013.

CHEN, Y.-T. et al. Development of biomarkers of genitourinary cancer using mass spectrometry-based clinical proteomics. **Journal of Food and Drug Analysis**, 27 out. 2018.

CHIVU-ECONOMESCU, M. et al. Knockdown of KRT17 by siRNA induces antitumoral effects on gastric cancer cells. **Gastric Cancer: Official Journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association**, v. 20, n. 6, p. 948–959, nov. 2017.

CHOKCHAICHAMNANKIT, D. et al. Urinary biomarkers for the diagnosis of cervical cancer by quantitative label-free mass spectrometry analysis. **Oncology Letters**, v. 17, n. 6, p. 5453–5468, 1 jun. 2019.

CHUMA, M. et al. Overexpression of cortactin is involved in motility and metastasis of hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 41, n. 4, p. 629–636, out. 2004.

CHUNG, H. et al. Downregulation of ERp57 expression is associated with poor prognosis in early-stage cervical cancer. **Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals**, v. 18, n. 7, p. 573–579, nov. 2013.

COATES, R. J. et al. Cancer risk in relation to serum copper levels. **Cancer Research**, v. 49, n. 15, p. 4353–4356, 1 ago. 1989.

COELHO, B. A. et al. Keratins 17 and 19 expression as prognostic markers in oral squamous cell carcinoma. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 14, n. 4, p. 15123–15132, 25 nov. 2015.

COFFMAN, L. G. et al. Regulatory effects of ferritin on angiogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 2, p. 570–575, 13 jan. 2009.

COORSSEN, J. R.; YERGEY, A. L. Proteomics Is Analytical Chemistry: Fitness-for-Purpose in the Application of Top-Down and Bottom-Up Analyses. **Proteomes**, v. 3, n. 4, p. 440–453, dez. 2015.

CORADEGHINI, R. et al. Differential expression of nuclear lamins in normal and cancerous prostate tissues. **Oncology Reports**, v. 15, n. 3, p. 609–613, mar. 2006.

CORRÊA, S. et al. Identifying potential markers in Breast Cancer subtypes using plasma label-free proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 33–42, 16 2017.

COSTA, J. H. G. et al. Prevenção do câncer de colo do útero em comunidades ribeirinhas atendidas pelo Programa Luz na Amazônia, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 4, p. 17–22, dez. 2011.

CROW, J. M. HPV: The global burden. **Nature**, v. 488, n. 7413, p. S2–S3, ago. 2012.

CRUZ, I. N. et al. Proteomics Analysis of Ovarian Cancer Cell Lines and Tissues Reveals Drug Resistance-associated Proteins. **Cancer Genomics - Proteomics**, v. 14, n. 1, p. 35–51, 1 jan. 2017.

DAI, F. et al. Identification of candidate biomarkers correlated with the diagnosis and prognosis of cervical cancer via integrated bioinformatics analysis. **OncoTargets and therapy**, v. 12, p. 4517–4532, 12 jun. 2019.

DASARI, S.; RAJENDRA, W.; VALLURU, L. Evaluation of soluble CD44 protein marker to distinguish the premalignant and malignant carcinoma cases in cervical cancer patients. **Medical Oncology (Northwood, London, England)**, v. 31, n. 9, p. 139, set. 2014.

DASARI, S.; WUDAYAGIRI, R.; VALLURU, L. Cervical cancer: Biomarkers for diagnosis and treatment. **Clinica Chimica Acta**, v. 445, p. 7–11, 20 maio 2015.

DASS, C. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience, 2007.

DE MARTEL, C. et al. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 4, p. 664–670, 2017.

DE PERGOLA, G.; SILVESTRIS, F. Obesity as a major risk factor for cancer. **Journal of Obesity**, v. 2013, p. 291546, 2013.

DE VISSER, K. E.; KORETS, L. V.; COUSSENS, L. M. Early Neoplastic Progression Is Complement Independent. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 6, n. 6, p. 768–776, nov. 2004.

DIACONU, N.-C. et al. Cervical squamous carcinoma cells are resistant to the combined action of tumor necrosis factor- α and histamine whereas normal keratinocytes undergo cytolysis. **BMC Cancer**, v. 8, n. 1, p. 46, 7 fev. 2008.

DITTMER, T. A.; MISTELI, T. The lamin protein family. **Genome Biology**, v. 12, n. 5, p. 222, 2011.

DLAMINI, Z.; MPHAHLELE, L. Molecular evaluation of ribosomal protein L9 gene (RPL9) in lung cancer. **Cancer Research**, v. 66, n. 8 Supplement, p. 770–770, 15 abr. 2006.

DOORBAR, J. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in Medical Virology**, v. 25, n. Suppl Suppl 1, p. 2–23, mar. 2015.

DU, J. et al. Loss of DMBT1 Expression in Human Prostate Cancer and Its Correlation with Clinical Progressive Features. **Urology**, v. 77, n. 2, p. 509.e9-509.e13, 1 fev. 2011.

ELIAS, J. E.; GYGI, S. P. Target-Decoy Search Strategy for Mass Spectrometry-Based Proteomics. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 604, p. 55–71, 2010.

ENG, J. K.; JAHAN, T. A.; HOOPMANN, M. R. Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool. **Proteomics**, v. 13, n. 1, p. 22–24, jan. 2013.

ESCOBAR-HOYOS, L. F. et al. Keratin 17 in premalignant and malignant squamous lesions of the cervix: proteomic discovery and immunohistochemical validation as a diagnostic and prognostic biomarker. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 27, n. 4, p. 621–630, abr. 2014.

ESPINDOLA, F. et al. Recursos de bioinformática aplicados às ciências ômicas como genômica, transcriptômica, proteômica, interatômica e metabolômica. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 26, n. 3, p. 463-477, maio 2010.

FARIA, A. V. et al. Classification of brain tumor extracts by high resolution ¹H MRS using partial least squares discriminant analysis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 2, p. 149–164, fev. 2011.

FAYAZFAR, S. et al. Early diagnosis of colorectal cancer via plasma proteomic analysis of CRC and advanced adenomatous polyp. **Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench**, v. 12, n. 4, p. 328–339, 1 set. 2019.

FENG, Y.; DOBERSTEIN, K.; DRAPKIN, R. Elafin: a double agent in breast and ovarian cancer. **Oncoscience**, v. 2, n. 10, p. 793–794, 17 set. 2015.

FENG, Y.; FANG, S.; LI, M. Expression of P21-activated kinase 1 and cell division control protein 42 homolog correlates with clinicopathological features and prognosis in cervical carcinoma. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 42, n. 7, p. 860–869, 2016.

FENN, J. B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64–71, 6 out. 1989.

FENSELAU, C.; DEMIREV, P. A. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, n. 4, p. 157–171, 2001.

FONG, L. W. R.; YANG, D. C.; CHEN, C.-H. Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS): a multirole signaling protein in cancers. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 36, n. 4, p. 737–747, 1 dez. 2017.

FONG, M. Y.; MCDUNN, J.; KAKAR, S. S. Identification of Metabolites in the Normal Ovary and Their Transformation in Primary and Metastatic Ovarian Cancer. **PLOS ONE**, v. 6, n. 5, p. e19963, 19 maio 2011.

FONSECA, F. V.; TOMASICH, F. D. S.; JUNG, J. E. Lesões cervicais intraepiteliais de alto grau: avaliação dos fatores determinantes de evolução desfavorável após conização. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 33, n. 11, p. 334–340, nov. 2011.

FRANCIS, T. et al. Histamine regulation of pancreatitis and pancreatic cancer: a review of recent findings. **Hepatobiliary Surgery and Nutrition**, v. 2, n. 4, p. 216–226, ago. 2013.

FU, Y. et al. Residual disease and risk factors in patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia and positive margins after initial conization. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 11, p. 851–856, 21 maio 2015.

FUCHS-TARLOVSKY, V. et al. Antioxidant supplementation has a positive effect on oxidative stress and hematological toxicity during oncology treatment in cervical cancer patients. **Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer**, v. 21, n. 5, p. 1359–1363, maio 2013.

FUJIMOTO, W. et al. Differential Expression of Human Cornifin α and β in Squamous Differentiating Epithelial Tissues and Several Skin Lesions. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 108, n. 2, p. 200–204, 1 fev. 1997.

FURUKAWA, K.; KONDO, T. Identification of the lamina-associated-polypeptide-2-binding domain of B-type lamin. **European journal of biochemistry**, v. 251, n. 3, p. 729–733, fev. 1998.

GAJBHIYE, A. et al. Multipronged quantitative proteomics reveals serum proteome alterations in breast cancer intrinsic subtypes. **Journal of Proteomics**, v. 163, p. 1–13, 23 jun. 2017.

GERKE, V.; MOSS, S. E. Annexins: From Structure to Function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 2, p. 331–371, 1 abr. 2002.

GHOSH, M. et al. Trappin-2/Elafin: a novel innate anti-human immunodeficiency virus-1 molecule of the human female reproductive tract. **Immunology**, v. 129, n. 2, p. 207–219, 2010.

GIACCIO, C. M. R. S. et al. Evolução das lesões intraepiteliais de colo uterino de baixo grau: em uma coorte de pacientes acompanhadas por 18 meses. **Diagn. tratamento**, 2010.

GIKA, H. G. et al. Evaluation of the repeatability of ultra-performance liquid chromatography-TOF-MS for global metabolic profiling of human urine samples. **Journal**

of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v. 871, n. 2, p. 299–305, 15 ago. 2008.

GIL-DE-LA-FUENTE, A. et al. CEU Mass Mediator 3.0: A Metabolite Annotation Tool. **Journal of Proteome Research**, v. 18, n. 2, p. 797–802, 2019.

GODOY-VITORINO, F. et al. Discriminating high-risk cervical Human Papilloma Virus infections with urinary biomarkers via non-targeted GC-MS-based metabolomics. **Plos One**, v. 13, n. 12, p. e0209936, 28 dez. 2018.

GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, R.; SAYAGO, A.; FERNÁNDEZ-RECAMALES, Á. Metabolomics in Alzheimer's disease: The need of complementary analytical platforms for the identification of biomarkers to unravel the underlying pathology. **Journal of Chromatography B**, Identification of molecules from non-targeted analysis. v. 1071, p. 75–92, 15 dez. 2017.

GORROCHATEGUI, E. et al. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 425–442, 1 set. 2016.

GRAFF, L. et al. Expression of histidine decarboxylase and synthesis of histamine by human small cell lung carcinoma. **The American Journal of Pathology**, v. 160, n. 5, p. 1561–1565, maio 2002.

GÜZEL, C. et al. Proteomic alterations in early stage cervical cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 26, p. 18128–18147, 6 abr. 2018.

HAAK-FRENDSCHO, M. et al. Histidine decarboxylase expression in human melanoma. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 3, p. 345–352, set. 2000.

HANASH, S.; SCHLIEKELMAN, M. Proteomic profiling of the tumor microenvironment: recent insights and the search for biomarkers. **Genome Medicine**, v. 6, n. 2, p. 12, 27 fev. 2014.

HAPCA, S. et al. PTU-040 HMGB1 in the pathogenesis of colorectal cancer. **Gut**, v. 67, n. Suppl 1, p. A192–A192, 1 jun. 2018.

HASSOUN, E. et al. Procollagen C-Proteinase Enhancer 1 (PCPE-1) as a Plasma Marker of Muscle and Liver Fibrosis in Mice. **Plos One**, v. 11, n. 7, p. e0159606, 2016.

HAY, R. T. SUMO: A History of Modification. **Molecular Cell**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 1 abr. 2005.

HE, Z. et al. RPLP1 promotes tumor metastasis and is associated with a poor prognosis in triple-negative breast cancer patients. **Cancer Cell International**, v. 18, n. 1, p. 170, 25 out. 2018.

HILDESHEIM, A. et al. Risk factors for rapid-onset cervical cancer. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 180, n. 3 Pt 1, p. 571–577, mar. 1999.

HOFF, F. W. et al. Proteomic Profiling of Acute Promyelocytic Leukemia Identifies Two Protein Signatures Associated with Relapse. **PROTEOMICS – Clinical Applications**, v. 0, n. 0, p. 1800133, 2019.

HOFFMANN, E. DE; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. 3rd ed ed. Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ: J. Wiley, 2007.

HOLTET, T. L. et al. Tetranectin, a trimeric plasminogen-binding C-type lectin. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v. 6, n. 7, p. 1511–1515, jul. 1997.

HOOGENBOEZEM, E. N.; DUVALL, C. L. Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Perspectives and review articles on nanomedicine from NanoDDS 2017. v. 130, p. 73–89, 1 maio 2018.

HOU, T. et al. Expression of COL6A1 predicts prognosis in cervical cancer patients. **American Journal of Translational Research**, v. 8, n. 6, p. 2838–2844, 15 jun. 2016.

HU, Q. et al. The Orbitrap: a new mass spectrometer. **Journal of mass spectrometry: JMS**, v. 40, n. 4, p. 430–443, abr. 2005.

HU, Z. et al. Ferritin: A potential serum marker for lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncology Letters**, v. 17, n. 1, p. 314–322, jan. 2019.

HUDLER, P.; KOCEVAR, N.; KOMEL, R. **Proteomic Approaches in Biomarker Discovery: New Perspectives in Cancer Diagnostics**. Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/260348/>>. Acesso em: 18 mar. 2019.

HUMAYUN-ZAKARIA, N. et al. Tropomyosins: Potential Biomarkers for Urothelial Bladder Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1102, jan. 2019.

HUNTINGTON, J. A.; STEIN, P. E. Structure and properties of ovalbumin. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, Elucidation of Allergens in Food. v. 756, n. 1, p. 189–198, 25 maio 2001.

IBARRA SIERRA, E. et al. Differential gene expression between skin and cervix induced by the E7 oncoprotein in a transgenic mouse model. **Virology**, v. 433, n. 2, p. 337–345, 25 nov. 2012.

ICHIKAWA, H. et al. Laser Microdissection and Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis Reveal the Role of a Novel Macrophage-Capping Protein in Lymph Node Metastasis in Gastric Cancer. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 8, p. 3780–3791, 2 ago. 2013.

ILHAN, Z. E. et al. Deciphering the complex interplay between microbiota, HPV, inflammation and cancer through cervicovaginal metabolic profiling. **EBioMedicine**, v. 44, p. 675–690, 1 jun. 2019.

INCA. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica. **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero**. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação

Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica – Rio de Janeiro: INCA, 2011.

INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2017.

ITO, S.; NAGATA, K. Biology of Hsp47 (Serpin H1), a collagen-specific molecular chaperone. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 62, p. 142–151, 2017.

IWAYA, K.; NORIO, K.; MUKAI, K. Coexpression of Arp2 and WAVE2 predicts poor outcome in invasive breast carcinoma. **Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 20, n. 3, p. 339–343, mar. 2007.

IZADYAR, S. Chapter 13 - Autonomic Nervous System. In: KASS, J. S.; MIZRAHI, E. M. (Eds.). **Neurology Secrets (Sixth Edition)**. Elsevier, p. 167–183, 2017.

JHA, S. et al. Destabilization of TIP60 by Human Papillomavirus E6 Results in Attenuation of TIP60-Dependent Transcriptional Regulation and Apoptotic Pathway. **Molecular Cell**, v. 38, n. 5, p. 700–711, jun. 2010.

JÚNIOR, C. A. S.; LIMA, L. R.; SILVA, I. L. C. DA. Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado: revisão da literatura. **REVISTA INTERDISCIPLINAR CIÊNCIAS E SAÚDE - RICS**, v. 4, n. 1, 25 jan. 2018.

JUNIOR, J. E.; GIRALDO, P. C.; GONÇALVES, A. K. Marcadores imunohistoquímicos de lesões precursoras do câncer do colo uterino associadas ao HPV: O papel da proteína de supressão tumoral P16INK4a. **J Bras Doenças Sex Transm**, v. 18, n. 1, p. 62–65, 2006.

KATAKURA, A. et al. A screening test for oral cancer using saliva samples: Proteomic analysis of biomarkers in whole saliva. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology**, v. 27, n. 1, p. 1–5, 1 jan. 2015.

KAWAHARA, Rebeca. **Proteômica baseada em espectrometria de massas na descoberta de candidatos à biomarcadores em câncer e na identificação de novos alvos de ADAM17**. 2015. 244 f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

KEBARLE, P.; TANG, L. From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 22, p. 972A-986A, 15 nov. 1993.

KEYMANESH, K.; DARVISHI, M. H.; SARDARI, S. Metabolome Comparison of Transgenic and Non-transgenic Rice by Statistical Analysis of FTIR and NMR Spectra. **Rice Science**, v. 16, n. 2, p. 119–123, 1 jun. 2009.

KHAN, I. et al. LC/MS-Based Polar Metabolite Profiling Identified Unique Biomarker Signatures for Cervical Cancer and Cervical Intraepithelial Neoplasia Using Global and Targeted Metabolomics. **Cancers**, v. 11, n. 4, p. 511, abr. 2019.

KHAN, M. J. et al. A Review on Desmogleins, Desmocollins and Associated Diseases. **American Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 04, p. 4053-4061, nov. 2017.

KIGURE, K. et al. An electrical scalpel conization versus Shimodaira-Taniguchi conization procedure for cervical intraepithelial neoplasia. **Medicine**, v. 97, n. 41, 12 out. 2018.

KIM, H.-J. et al. LAP2 Is Widely Overexpressed in Diverse Digestive Tract Cancers and Regulates Motility of Cancer Cells. **Plos One**, v. 7, n. 6, p. e39482, 20 jun. 2012.

KIM, Y. J. et al. Verification of the Biomarker Candidates for Non-small-cell Lung Cancer Using a Targeted Proteomics Approach. **Journal of Proteome Research**, v. 14, n. 3, p. 1412–1419, 6 mar. 2015.

KIMURA, K. et al. Proteomic identification of the macrophage-capping protein as a protein contributing to the malignant features of hepatocellular carcinoma. **Journal of Proteomics**, v. 78, p. 362–373, 14 jan. 2013.

KONG, J. et al. High expression of ezrin predicts poor prognosis in uterine cervical cancer. **BMC cancer**, v. 13, p. 520, 4 nov. 2013.

KONG, J. et al. Ezrin contributes to cervical cancer progression through induction of epithelial-mesenchymal transition. **Oncotarget**, v. 7, n. 15, p. 19631–19642, 27 fev. 2016.

KOSS, L. G.; GOMPEL, C. **Introdução à Citopatologia Ginecológica com Correlações Histológicas e Clínicas**. 1. ed. São Paulo: ROCA, 2006.

KUHN, M. caret: Classification and Regression Training. **Astrophysics Source Code Library**, p. ascl:1505.003, maio 2015.

LAI, K. K. Y. et al. Extracellular Matrix Dynamics in Hepatocarcinogenesis: A Comparative Proteomics Study of PDGFC Transgenic and Pten Null Mouse Models. **Plos Genetics**, v. 7, n. 6, 23 jun. 2011.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35–61, 2009.

LANG, Z. et al. Prognostic and clinicopathological significance of CapG in various cancers: evidence from a meta-analysis. **Pathology - Research and Practice**, p. 152683, 12 out. 2019.

LARIO, S. et al. Plasma sample based analysis of gastric cancer progression using targeted metabolomics. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 19 dez. 2017.

LAW, R. H. et al. An overview of the serpin superfamily. **Genome Biology**, v. 7, n. 5, p. 216, 2006.

LEAL, Juliana Cardoso. **Análise proteômica dos secretomas dos fungos *Trichoderma harzianum* e *Fusarium solani***. 2019. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, 2019.

LEI, T. et al. Discovery of potential bladder cancer biomarkers by comparative urine proteomics and analysis. **Clinical Genitourinary Cancer**, v. 11, n. 1, p. 56–62, mar. 2013.

LI, C.; WU, J.; ZHOU, Q. Peroxiredoxin 6 highly expressed in human cervical squamous cell carcinoma. **Journal of Science and Applications: Biomedicine**, v. 2, n. 6, p. 32, nov. 2014.

LI, J. et al. The four-transmembrane protein MAL2 and tumor protein D52 (TPD52) are highly expressed in colorectal cancer and correlated with poor prognosis. **PLOS ONE**, v. 12, n. 5, p. e0178515, 31 maio 2017.

LI, J.; DING, Y.; LI, A. Identification of COL1A1 and COL1A2 as candidate prognostic factors in gastric cancer. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 14, n. 1, p. 297, 29 nov. 2016.

LI, S.; WEI, Y. Association of HMGB1, BRCA1 and P62 expression in ovarian cancer and chemotherapy sensitivity. **Oncology Letters**, v. 15, n. 6, p. 9572–9576, 1 jun. 2018.

LI, Y.-R.; YANG, W.-X. Myosin superfamily: The multi-functional and irreplaceable factors in spermatogenesis and testicular tumors. **Gene**, v. 576, n. 1, Part 2, p. 195–207, 15 jan. 2016.

LIANG, J. et al. β -Catenin Expression Negatively Correlates with WIF1 and Predicts Poor Clinical Outcomes in Patients with Cervical Cancer. **BioMed Research International**, 2016; 2016:492390, p. 9, oct. 2016.

LIMA, M. I. M.; LODI, C. T. C.; LIMA, S. A.; LUCENA, A. A. S.; GUIMARÃES, M. V. M. B.; MEIRA, H. R. C.; MELO, V. H. Conização com cirurgia de alta frequência na neoplasia intraepitelial cervical: quando usar a alça de canal? **Femina**, v.39, n. 4, p. 183, abr. 2011.

LIN, W. et al. Studies on diagnostic biomarkers and therapeutic mechanism of Alzheimer's disease through metabolomics and hippocampal proteomics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 119–126, 15 jul. 2017.

LINGAIAH, S. et al. Serum retinol-binding protein 4 levels in polycystic ovary syndrome. **Endocrine Connections**, v. 8, n. 6, p. 709–717, 3 maio 2019.

LIU, H. et al. Identification of Cervical Cancer Proteins Associated with Treatment With Paclitaxel and Cisplatin in Patients. **International Journal of Gynecologic Cancer**, v. 21, n. 8, p. 1452–1457, 1 nov. 2011.

LIU, S.; LIAO, G.; LI, G. Regulatory effects of COL1A1 on apoptosis induced by radiation in cervical cancer cells. **Cancer Cell International**, v. 17, n. 1, p. 73, 28 jul. 2017.

LIU, W. et al. Serum proteomics for gastric cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 431, p. 179–184, 20 abr. 2014.

LIU, X.; LOCASALE, J. W. Metabolomics: A Primer. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 4, p. 274–284, 1 abr. 2017.

LOBELLO, N. et al. Ferritin heavy chain is a negative regulator of ovarian cancer stem cell expansion and epithelial to mesenchymal transition. **Oncotarget**, v. 7, n. 38, p. 62019–62033, 22 ago. 2016.

LOKAMANI, I. et al. Gelsolin and ceruloplasmin as potential predictive biomarkers for cervical cancer by 2D-DIGE proteomics analysis. **Pathology oncology research: POR**, v. 20, n. 1, p. 119–129, jan. 2014.

LOMNYTSKA, M. I. et al. Diagnostic protein marker patterns in squamous cervical cancer. **Proteomics. Clinical Applications**, v. 4, n. 1, p. 17–31, jan. 2010.

LOMNYTSKA, M. I. et al. Differential expression of ANXA6, HSP27, PRDX2, NCF2, and TPM4 during uterine cervix carcinogenesis: diagnostic and prognostic value. **British Journal of Cancer**, v. 104, n. 1, p. 110–119, 4 jan. 2011.

LOOI, M. L. et al. Plasma proteome analysis of cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma. **Journal of Biosciences**, v. 34, n. 6, p. 917–925, 1 dez. 2009.

LOPES, E. M. et al. Vanilla bahiana, a contribution from the Atlantic Forest biodiversity for the production of vanilla: A proteomic approach through high-definition nanoLC/MS. **Food Research International**, v. 120, p. 148–156, 1 jun. 2019.

LÓPEZ-SÁEZ, J. F. et al. Cell proliferation and cancer. **Histology and Histopathology**, v. 13, n. 4, p. 1197–1214, 1998.

LOTZE, M. T.; TRACEY, K. J. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. **Nature Reviews. Immunology**, v. 5, n. 4, p. 331–342, abr. 2005.

PORCARI, A. et al. Molecular Signatures of High-Grade Cervical Lesions. **Frontiers Oncology**, v. 8, p.99, abr. 2018.

MA, J. et al. The relationship between cervical precancerous lesion galectin-3 and p27 protein expression and clinical prognosis. **Oncology Letters**, v. 15, n. 2, p. 1533–1536, fev. 2018.

MACHESKY, L. M. et al. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from Acanthamoeba by affinity chromatography on profilin-agarose. **The Journal of Cell Biology**, v. 127, n. 1, p. 107–115, out. 1994.

MAIMAITI, Y. et al. Overexpression of cofilin correlates with poor survival in breast cancer: A tissue microarray analysis. **Oncology Letters**, v. 14, n. 2, p. 2288–2294, ago. 2017.

MAJIDZADEH-A, K.; GHARECHAHI, J. Plasma proteomics analysis of tamoxifen resistance in breast cancer. **Medical Oncology**, v. 30, n. 4, p. 753, 26 out. 2013.

MALUF, P. J.; ADAD, S. J.; MURTA, E. F. C. Outcome after conization for cervical intraepithelial neoplasia grade III: relation with surgical margins, extension to the crypts and mitoses. **Tumori**, v. 90, n. 5, p. 473–477, out. 2004.

MANAI, M. et al. MARCKS protein overexpression in inflammatory breast cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 4, p. 6246–6257, 24 jan. 2017.

MANTSIOU, A. et al. Proteomics Analysis of Formalin Fixed Paraffin Embedded Tissues in the Investigation of Prostate Cancer. **Journal of Proteome Research**, 4 nov. 2019.

MAO, X. et al. Metabolomics in gestational diabetes. **Clinica Chimica Acta**, v. 475, p. 116–127, 1 dez. 2017.

MARASCHIN, M. et al. Metabolômica e quimiometria como ferramentas para análises químio (bio) diversas. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**, v. 4, p. 17–49, 2017.

MARTINY, P. B. et al. A proteomic glimpse into the oncogenesis of prostate cancer. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 16, n. 4, p. 328–336, 1 nov. 2018.

MARUYAMA, Y. et al. Short Hairpin RNA Library-Based Functional Screening Identified Ribosomal Protein L31 That Modulates Prostate Cancer Cell Growth via p53 Pathway. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, p. e108743, 6 out. 2014.

MATTHEWS, H.; HANISON, J.; NIRMALAN, N. “Omics”-Informed Drug and Biomarker Discovery: Opportunities, Challenges and Future Perspectives. **Proteomes**, v. 4, n. 3, p. 28, 12 set. 2016.

MATTOSCIO, D. et al. The SUMO conjugating enzyme UBC9 as a biomarker for cervical HPV infections. **ecancermedicalscience**, v. 9, 29 abr. 2015.

MATYASH, V. et al. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. **Journal of Lipid Research**, v. 49, n. 5, p. 1137–1146, 5 jan. 2008.

MEDINA, V. et al. The role of histamine in human mammary carcinogenesis: H3 and H4 receptors as potential therapeutic targets for breast cancer treatment. **Cancer biology & therapy**, v. 7, p. 28–35, 1 jan. 2008.

MEIER, R. et al. Bioinformatics can boost metabolomics research. **Journal of Biotechnology**, Bioinformatics Solutions for Big Data Analysis in Life Sciences presented by the German Network for Bioinformatics Infrastructure. v. 261, p. 137–141, 10 nov. 2017.

MELO, E. M. F. DE et al. Cervical cancer: knowledge, attitude and practice on the prevention examination. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 72, p. 25–31, dez. 2019.

MENDONÇA, V. G. DE et al. Mortalidade por câncer do colo do útero: características sociodemográficas das mulheres residentes na cidade de Recife, Pernambuco. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 5, p. 248–255, maio 2008.

MIRANDA, D. B. DE et al. Perfil epidemiológico das pacientes em unidade saúde da família em Goiânia (Goiás, Brasil). **Revista do CEAM**, v. 4, n. 1, p. 56–65, 14 nov. 2018.

MITTELDORF, C. A. T. S. Cervical cancer screening: from Pap smear to future strategies. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 52, n. 4, p. 238–245, set. 2016.

MOCELLIN, S. et al. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 16, n. 1, p. 35–53, 1 fev. 2005.

MOCKLER, D. et al. Keratin 17 Is a Prognostic Biomarker in Endocervical Glandular Neoplasia. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 148, n. 3, p. 264–273, 1 set. 2017.

MOLAVI, G.; SAMADI, N.; HOSSEINGHOLI, E. Z. The roles of moonlight ribosomal proteins in the development of human cancers. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 6, p. 8327–8341, 1 jun. 2019.

MOLINIE, N.; GAUTREAU, A. The Arp2/3 Regulatory System and Its Deregulation in Cancer. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 1, p. 215–238, 6 dez. 2017.

MORAES, C. S.; OLIVEIRA JUNIOR, F. O. R; MASSON, G. **Métodos experimentais no estudo de proteínas**. 1. ed. Rio de Janeiro: IOC, p. 8383, 2013.

MOREIRA, M. B. et al. Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. **Quim. Nova**, n. 00, p. 6, 2014.

MORENO, P. et al. Metabolomic profiling of human lung tumor tissues – nucleotide metabolism as a candidate for therapeutic interventions and biomarkers. **Molecular Oncology**, v. 12, n. 10, p. 1778–1796, out. 2018.

MOTOMURA, K. et al. DMBT1 Homozygous Deletion in Diffuse Astrocytomas Is Associated With Unfavorable Clinical Outcome. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 71, n. 8, p. 702–707, 1 ago. 2012.

MOTOYAMA, A.; YATES, J. R. Multidimensional LC Separations in Shotgun Proteomics. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 19, p. 7187–7193, out. 2008.

MOTZ, G. T.; COUKOS, G. The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cancer and other tales. **Nature Reviews. Immunology**, v. 11, n. 10, p. 702–711, 23 2011.

MU, H. et al. 324 CapG is Highly Expressed in Prostate Cancer and Affects Cell Apoptosis, Proliferation and Migration. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 14, n. 1, p. S93–S94, 1 jan. 2017.

MURILLO, R. et al. **HPV Prevalence in Colombian Women with Cervical Cancer: Implications for Vaccination in a Developing Country**. Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/idoj/2009/653598/>>. Acesso em: 2 mar. 2018.

MURTA, E. F. C. et al. Câncer do Colo Uterino: Correlação com o Início da atividade Sexual e Paridade. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 21, n. 9, p. 555–559, out. 1999.

NAKAGAWA, J. T. et al. Carcinoma do colo do útero: taxa de sobrevida e fatores prognósticos em mulheres no Estado de Mato Grosso. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 24, n. 5, p. 631–637, 2011.

NYAMUNDANDA, G.; BRENNAN, L.; GORMLEY, I. C. Probabilistic principal component analysis for metabolomic data. **BMC bioinformatics**, v. 11, p. 571, 23 nov. 2010.

OLIVEIRA, C. HPV de Alto e Baixo Risco para Câncer: Toda Regra Tem sua Exceção. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 23, n. 4, p. 171–173, 2011.

OMS. **Mortes por câncer aumentaram 31% no Brasil em 15 anos, diz OMS - Saúde**. Disponível em: <<http://saude.estadao.com.br/noticias/geral,mortes-por-cancer-aumentaram-31-no-brasil-em-15-anos,70001652056>>. Acesso em: 6 mar. 2018.

ONG, S.-E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nature Chemical Biology**, v. 1, n. 5, p. 252–262, out. 2005.

ORTIZ, G. et al. Abstract 3267: Cervical microbiota and the urinary metabolome in patients with high-risk and low-risk HPV infections. **Cancer Research**, v. 78, n. 13 Supplement, p. 3267–3267, 1 jul. 2018.

OSSOLIŃSKI, K. et al. Mass spectrometry-based metabolomic profiling of prostate cancer - a pilot study. **Journal of Cancer Metastasis and Treatment**, v. 2019, 8 jan. 2019.

OSTADE, X. V.; DOM, M.; RAEMDONCK, G. V. IPA Analysis of Cervicovaginal Fluid from Precancerous Women Points to the Presence of Biomarkers for the Precancerous State of Cervical Carcinoma. **Proteomes**, v. 2, n. 3, p. 426, set. 2014.

OTSUBO, T. et al. Involvement of Arp2/3 complex in the process of colorectal carcinogenesis. **Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 17, n. 4, p. 461–467, abr. 2004.

PAMPALONA, J. et al. Progressive telomere dysfunction causes cytokinesis failure and leads to the accumulation of polyploid cells. **Plos Genetics**, v. 8, n. 4, p. e1002679, 2012.

PANG, X. et al. Expression and effects of high-mobility group box 1 in cervical cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 8699–8712, 15 maio 2014.

PANIS, C. et al. Early downregulation of acute phase proteins after doxorubicin exposition in patients with breast cancer. **Tumor Biology**, v. 37, n. 3, p. 3775–3783, 1 mar. 2016.

PANIS, C. et al. The Role of Proteomics in Cancer Research. In: **Oncogenomics**. Elsevier, p. 31–55, 2019.

PAPPA, I. K. et al. Proteomic Analysis of Normal and Cancer Cervical Cell Lines Reveals Deregulation of Cytoskeleton-associated Proteins. **Cancer Genomics & Proteomics**, v. 14, n. 4, p. 253–266, 3 jul. 2017.

PARK, K.-S. et al. Proteomic analysis and molecular characterization of tissue ferritin light chain in hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 35, n. 6, p. 1459–1466, 1 jun. 2002.

PARTHEEN, K. et al. Four potential biomarkers as prognostic factors in stage III serous ovarian adenocarcinomas. **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 9, p. 2130–2137, 2008.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy: Innovation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 4, p. 263–269, abr. 2012.

PAULIS, Y. W. J. et al. CD44 enhances tumor aggressiveness by promoting tumor cell plasticity. **Oncotarget**, v. 6, n. 23, p. 19634–19646, 15 abr. 2015.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning, p.716, 2010.

PENG, F. et al. Dissecting characteristics and dynamics of differentially expressed proteins during multistage carcinogenesis of human colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 18, p. 4515–4528, 14 maio 2016.

PFUNDT, R. et al. Constitutive and inducible expression of SKALP/elafin provides anti-elastase defense in human epithelia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 6, p. 1389–1399, 15 set. 1996.

PIO, R.; AJONA, D.; LAMBRIS, J. D. Complement inhibition in cancer therapy. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 1, p. 54–64, fev. 2013.

PLUMMER, M. et al. Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case--control study. **Cancer causes & control: CCC**, v. 14, n. 9, p. 805–814, nov. 2003.

POTTIER, C. et al. Microproteomic Profiling of High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion of the Cervix: Insight into Biological Mechanisms of Dysplasia and New Potential Diagnostic Markers. **PROTEOMICS – Clinical Applications**, v. 13, n. 1, p. 1800052, 2019.

PROITSI, P. et al. Plasma lipidomics analysis finds long chain cholesteryl esters to be associated with Alzheimer's disease. **Translational Psychiatry**, v. 5, n. 1, p. e494, jan. 2015.

PUNT, S. et al. Galectin-1, -3 and -9 Expression and Clinical Significance in Squamous Cervical Cancer. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, 12 jun. 2015.

QADIR, M. I.; PARVEEN, A.; ALI, M. Cdc42: Role in Cancer Management. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 86, n. 4, p. 432–439, 1 out. 2015.

QI, H. et al. Role of annexin A6 in cancer. **Oncology Letters**, v. 10, n. 4, p. 1947–1952, out. 2015.

RACHAKONDA, V.; PAN, T. H.; LE, W. D. Biomarkers of neurodegenerative disorders: how good are they? **Cell Research**, v. 14, n. 5, p. 347–358, out. 2004.

RADSPIELER, M. M. et al. Lamin-B1 is a senescence-associated biomarker in clear-cell renal cell carcinoma. **Oncology Letters**, v. 18, n. 3, p. 2654–2660, set. 2019.

RAI, V. et al. "Omics" in oral cancer: New approaches for biomarker discovery. **Archives of Oral Biology**, v. 87, p. 15–34, 1 mar. 2018.

RAMA, C. H. et al. Prevalence of genital HPV infection among women screened for cervical cancer. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, n. 1, p. 123–130, fev. 2008.

RAZ, V. et al. Nuclear entrapment and extracellular depletion of PCOLCE is associated with muscle degeneration in oculopharyngeal muscular dystrophy. **BMC neurology**, v. 13, p. 70, 1 jul. 2013.

REFETOFF, S. et al. Thyroxine-binding globulin: organization of the gene and variants. **Hormone Research**, v. 45, n. 3–5, p. 128–138, 1996.

RESCHER, U.; GERKE, V. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. Pt 13, p. 2631–2639, 1 jun. 2004.

RIBEIRO, J. C.; ANDRADE, S. R. DE. HEALTH SURVEILLANCE AND PAP TEST COVERAGE: INTEGRATIVE REVIEW. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 25, n. 4, 2016.

RICHART, R. M. Cervical intraepithelial neoplasia. **Pathology Annual**, v. 8, p. 301–328, 1973.

RITZ, U. et al. Deficient expression of components of the MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma. **International Journal of Oncology**, v. 19, n. 6, p. 1211–1220, 1 dez. 2001.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, M. A. et al. In silico analysis of protein neoplastic biomarkers for cervix and uterine cancer. **Clinical and Translational Oncology**, v. 10, n. 10, p. 604, 1 nov. 2008.

ROSA, M. I. DA et al. Human papillomavirus and cervical neoplasia. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 5, p. 953–964, maio 2009a.

ROSA, M. I. DA et al. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 5, p. 953–964, maio 2009b.

ROSAGER, A. M. et al. Transferrin receptor-1 and ferritin heavy and light chains in astrocytic brain tumors: Expression and prognostic value. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0182954, 24 ago. 2017.

ROUX, A. et al. Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 119–135, jan. 2011.

RUBIN, M. A. et al. Overexpression, amplification, and androgen regulation of TPD52 in prostate cancer. **Cancer Research**, v. 64, n. 11, p. 3814–3822, 1 jun. 2004.

RUSSO, A. et al. rPL3 promotes the apoptosis of p53 mutated lung cancer cells by down-regulating CBS and NFκB upon 5-FU treatment. **Scientific Reports**, v. 6, p. 38369, 7 dez. 2016.

SAHU, A.; LAMBRIS, J. D. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. **Immunological Reviews**, v. 180, p. 35–48, abr. 2001.

SALVATO, F.; CARVALHO, M. C. DA C. G. DE. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 727–734, 26 fev. 2010.

SANCHES, T. T. et al. Evolution of the public health system in Brazil versus the current stage of cervical cancer prevention in young women and adolescents. **Revista de la Facultad de Medicina**, v. 65, n. 1, p. 115–120, mar. 2017.

SÁNCHEZ, B. et al. Omics for the study of probiotic microorganisms. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 1061–1071, 1 nov. 2013.

SANTOS, Felipe Antunes dos. **Quimiometria aplicada à metabolômica de Aldama La Llave: contribuições quimiotaconômicas e fitoquímica direcionada baseada em inibição de ciclooxigenase-1 e 5-lipoxigenase**. 2015. 144 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SAUER, U. G. et al. The challenge of the application of 'omics technologies in chemicals risk assessment: Background and outlook. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Applying 'Omics Technologies in Chemicals Risk Assessment. v. 91, p. S14–S26, 1 dez. 2017.

SCHALLEY, C. A. Supramolecular chemistry goes gas phase: the mass spectrometric examination of noncovalent interactions in host–guest chemistry and molecular recognition. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 194, n. 1, p. 11–39, 1 jan. 2000.

SEMBA, S. et al. Coexpression of actin-related protein 2 and Wiskott-Aldrich syndrome family verproline-homologous protein 2 in adenocarcinoma of the lung. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 12, n. 8, p. 2449–2454, 15 abr. 2006.

SENRA VARELA, A.; LOPEZ SAEZ, J. J.; QUINTELA SENRA, D. Serum ceruloplasmin as a diagnostic marker of cancer. **Cancer Letters**, v. 121, n. 2, p. 139–145, 23 dez. 1997.

SHAH, S.; KALAL, B. S. Oxidative stress in cervical cancer and its response to chemoradiation. **Turkish Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 16, n. 2, p. 124–128, jun. 2019.

SHAW, L.; WIEDOW, O. Therapeutic potential of human elafin. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, n. 5, p. 1450–1454, out. 2011.

SHEKE, G., H., L. The Changes of the Six Proteomic Profiling in Initiation and Development of Cervical Cancer. **Journal of Basic and Clinical Oncology**, 2007.

SHENG, X. et al. Clinical value of serum HMGB1 levels in early detection of recurrent squamous cell carcinoma of uterine cervix: comparison with serum SCCA, CYFRA21-1, and CEA levels. **Croatian Medical Journal**, v. 50, n. 5, p. 455–464, out. 2009.

SHI, J. et al. Biological Function of Ribosomal Protein L10 on Cell Behavior in Human Epithelial Ovarian Cancer. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 4, p. 745–756, 6 fev. 2018.

SHIH, C.-C. et al. Role of PGRMC1 in cell physiology of cervical cancer. **Life Sciences**, v. 231, p. 116541, 15 ago. 2019.

SHRUTHI, B. S.; VINODHKUMAR, P.; SELVAMANI. Proteomics: A new perspective for cancer. **Advanced Biomedical Research**, v. 5, 19 abr. 2016.

SIDOLI, S.; GARCIA, B. A. Middle-down proteomics: a still unexploited resource for chromatin biology. **Expert Review of Proteomics**, v. 14, n. 7, p. 617–626, 2017.

SILVA, R. C. G. DA et al. Liquid medium cytology performance in identification of cervico-vaginal microbiological agentes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 2, 2018.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 1994.

SIMÕES, M. L.; BARBOSA, L. E. Obesidade: impacto no Carcinoma Colorretal. **Revista Portuguesa de Cirurgia**, n. 42, p. 17–32, set. 2017.

SINGH, S. et al. Cancer Drug Development of Carbonic Anhydrase Inhibitors beyond the Active Site. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1045, maio 2018.

SOCIETY, T. A. C. **The American Cancer Society's Oncology in Practice: Clinical Management**. John Wiley & Sons, 2018.

SONG, D. et al. Effect of human papillomavirus infection on the immune system and its role in the course of cervical cancer (Review). **Oncology Letters**, v. 10, n. 2, p. 600–606, 1 ago. 2015.

SOUZA, J. H. K. DE et al. Evaluation of cervical slides previously diagnosed as ASCUS: interassay and interobserver comparison. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, n. 3, p. 233–240, 2004.

SOUZA, Rennan Crocci de. **Investigação de parceiros moleculares de Cdc42 em linhagens de células humanas submetidas a estresse genotóxico**. 2016. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

SOUZA, L. D. L.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J. A. A importância das ômicas como ferramentas para o estudo da prospecção de Microrganismos: perspectivas e desafios. **Revista Uningá Review**, v. 18, n. 2, 2014.

SPECK, N. M. DE G. et al. Cervical cancer screening in young and elderly women of the Xingu Indigenous Park: evaluation of the recommended screening age group in Brazil. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. 1, p. 52–57, mar. 2015.

SRIVASTAVA, M.; KHURANA, P.; SUGADEV, R. Lung Cancer Signature Biomarkers: tissue specific semantic similarity based clustering of Digital Differential Display (DDD) data. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 1, p. 617, 2 nov. 2012.

STABILE, S. A. B. et al. Comparative study of the results from conventional cervico-vaginal oncotic cytology and liquid-based cytology. **Einstein (São Paulo)**, v. 10, n. 4, p. 466–472, dez. 2012.

STAGLJAR, I. The power of OMICs. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 479, n. 4, p. 607–609, 28 out. 2016.

STARODUBTSEVA, N. L. et al. Label-free cervicovaginal fluid proteome profiling reflects the cervix neoplastic transformation. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 54, n. 8, p. 693–703, 2019.

STENGEL, K.; ZHENG, Y. Cdc42 in oncogenic transformation, invasion, and tumorigenesis. **Cellular signalling**, v. 23, n. 9, p. 1415–1423, set. 2011.

SU, Q.; LEI, T.; ZHANG, M. Association of ferritin with prostate cancer. **Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 22, n. 3, p. 766–770, 2017.

SUGIMOTO, M. et al. Bioinformatics Tools for Mass Spectroscopy-Based Metabolomic Data Processing and Analysis. **Current Bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 96–108, mar. 2012.

SUN, S. et al. Circulating Lamin B1 (LMNB1) biomarker detects early stages of liver cancer in patients. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 1, p. 70–78, jan. 2010.

SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrase activators. **Future Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 5, p. 561–573, 26 fev. 2018.

SWITZAR, L.; GIERA, M.; NIESSEN, W. M. A. Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 3, p. 1067–1077, 1 mar. 2013.

SYRJÄNEN, S. et al. Up-regulation of lipocalin 2 is associated with high-risk human papillomavirus and grade of cervical lesion at baseline but does not predict outcomes of infections or incident cervical intraepithelial neoplasia. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 134, n. 1, p. 50–59, jul. 2010.

SZELAG, A.; MERWID-LAD, A.; TROCHA, M. [Histamine receptors in the female reproductive system. Part I. Role of the mast cells and histamine in female reproductive system]. **Ginekologia polska**, v. 73, n. 7, p. 627–635, jul. 2002.

SZKLARCZYK, D. et al. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D607–D613, 8 jan. 2019.

TAKEUCHI, T. Structural comparison of dermatopontin amino acid sequences. **Biologia**, v. 65, n. 5, p. 874–879, 1 out. 2010.

TANG, D. et al. High-mobility Group Box 1 [HMGB1] and Cancer. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1799, n. 1–2, p. 131, 2010.

THOMPSON, C. C. et al. Pancreatic cancer cells overexpress gelsolin family-capping proteins, which contribute to their cell motility. **Gut**, v. 56, n. 1, p. 95–106, jan. 2007.

THULER, L. C. S. Mortalidade por câncer do colo do útero no Brasil. **Rev bras ginecol obstet**, v. 30, p. 216–8, 2008.

TORTI, F. M.; TORTI, S. V. Regulation of ferritin genes and protein. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3505–3516, 15 maio 2002.

TRUSHINA, E.; MIELKE, M. M. Recent advances in the application of metabolomics to Alzheimer's Disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, Misfolded Proteins, Mitochondrial Dysfunction, and Neurodegenerative Diseases. v. 1842, n. 8, p. 1232–1239, 1 ago. 2014.

TSUGAWA, H. et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. **Nature Methods**, v. 12, n. 6, p. 523–526, jun. 2015.

UCHIYAMA, K. et al. Serum metabolomics analysis for early detection of colorectal cancer. **Journal of Gastroenterology**, v. 52, n. 6, p. 677–694, jun. 2017.

ULEBERG, K.-E. et al. Discrimination of grade 2 and 3 cervical intraepithelial neoplasia by means of analysis of water soluble proteins recovered from cervical biopsies. **Proteome Science**, v. 9, p. 36, 28 jun. 2011.

VADON-LE GOFF, S. et al. Procollagen C-proteinase enhancer stimulates procollagen processing by binding to the C-propeptide region only. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 45, p. 38932–38938, 11 nov. 2011.

VALERO, A. et al. Deleted in Malignant Brain Tumor 1 (DMBT1) Expression Pattern in Normal Cervix and at Different Stages of Squamous Intraepithelial Lesions. **The Open Biomarkers Journal**, v. 8, n. 1, 23 jan. 2018.

VAN OSTADE, X. et al. Candidate biomarkers in the cervical vaginal fluid for the (self-)diagnosis of cervical precancer. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 297, n. 2, p. 295–311, 1 fev. 2018.

VAN RAEMDONCK, G. A. A. et al. Identification of Protein Biomarkers for Cervical Cancer Using Human Cervicovaginal Fluid. **Plos One**, v. 9, n. 9, 12 set. 2014.

VESSECCHI, R. et al. Mass spectrometry nomenclature in portuguese language. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1875–1887, 2011.

VILLAS-BÔAS, S. G. et al. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, n. 5, p. 613–646, 2005.

WANG, D. et al. Carbonic anhydrase 1 is a promising biomarker for early detection of non-small cell lung cancer. **Tumor Biology**, v. 37, n. 1, p. 553–559, 1 jan. 2016.

WANG, S. et al. Up-regulation of PCOLCE by TWIST1 promotes metastasis in Osteosarcoma. **Theranostics**, v. 9, n. 15, p. 4342–4353, 9 jun. 2019.

WANG, Y. et al. FcGBP was upregulated by HPV infection and correlated to longer survival time of HNSCC patients. **Oncotarget**, v. 8, n. 49, p. 86503–86514, 23 set. 2017.

WEBBER, J. P. et al. Prostate stromal cell proteomics analysis discriminates normal from tumour reactive stromal phenotypes. **Oncotarget**, v. 7, n. 15, p. 20124–20139, 25 fev. 2016.

WEI, R. Chapter Thirteen - A Step-Up LC-MS/MS for Proteomics. In: CAPPIELLO, A.; PALMA, P. (Eds.). **Comprehensive Analytical Chemistry**. Advances in the Use of Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS). Elsevier, v. 79p. 377–414, 2018.

WEIPING, L. et al. Elevated serum RBP4 is associated with insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. **Endocrine**, v. 30, n. 3, p. 283–287, dez. 2006.

WILKINS, M. R. et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 19–50, 1996.

WILLIAMS, D. B. Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. Pt 4, p. 615–623, 15 fev. 2006.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, PLS Methods. v. 58, n. 2, p. 109–130, 28 out. 2001.

WU, T. et al. Expression of Ferritin Light Chain (FTL) Is Elevated in Glioblastoma, and FTL Silencing Inhibits Glioblastoma Cell Proliferation via the GADD45/JNK Pathway. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0149361, 12 fev. 2016.

WU, Y. et al. Over-expression of miR-15a-3p enhances the radiosensitivity of cervical cancer by targeting tumor protein D52. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 1325–1334, 1 set. 2018.

XU, C.-J.; HOEFSLOOT, H. C.; SMILDE, A. K. To aggregate or not to aggregate high-dimensional classifiers. **BMC Bioinformatics**, v. 12, p. 153, 13 maio 2011.

YAMADA, S.; TANIMOTO, A.; SASAGURI, Y. Critical in vivo roles of histamine and histamine receptor signaling in animal models of metabolic syndrome. **Pathology International**, v. 66, n. 12, p. 661–671, 2016.

YAMAGUCHI, H. et al. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. **The Journal of Cell Biology**, v. 168, n. 3, p. 441–452, 31 jan. 2005.

YAMAMOTO, N. et al. Tumor-suppressive microRNA-29a inhibits cancer cell migration and invasion via targeting HSP47 in cervical squamous cell carcinoma. **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 6, p. 1855–1863, 18 out. 2013.

YAMATOJI, M. et al. Dermatopontin: A potential predictor for metastasis of human oral cancer. **International Journal of Cancer**, v. 130, n. 12, p. 2903–2911, 2012.

YANG, K. et al. A Comprehensive Analysis of Metabolomics and Transcriptomics in Cervical Cancer. **Scientific Reports**, v. 7, 22 fev. 2017.

YANG, L.; ZHANG, S.; WANG, G. Keratin 17 in disease pathogenesis: from cancer to dermatoses. **The Journal of Pathology**, v. 247, n. 2, p. 158–165, 2019.

YE, N.; LIU, C.; SHI, P. Metabolomics analysis of cervical cancer, cervical intraepithelial neoplasia and chronic cervicitis by ¹H NMR spectroscopy. **European Journal of Gynaecological Oncology**, v. 36, n. 2, p. 174–180, 2015.

YIN, L.-M.; ULLOA, L.; YANG, Y.-Q. Transgelin-2: Biochemical and Clinical Implications in Cancer and Asthma. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 44, n. 10, p. 885–896, 1 out. 2019.

YIN, M.; MA, W.; AN, L. Cortactin in cancer cell migration and invasion. **Oncotarget**, v. 8, n. 50, p. 88232–88243, 19 set. 2017.

YUMBA MPANGA, A. et al. Targeted metabolomics in bladder cancer: From analytical methods development and validation towards application to clinical samples. **Analytica Chimica Acta**, 3 fev. 2018.

ZARDO, G. P. et al. Vacina como agente de imunização contra o HPV. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 9, p. 3799–3808, set. 2014.

ZHAN, X. et al. The differentially mitochondrial proteomic dataset in human ovarian cancer relative to control tissues. **Data in Brief**, v. 20, p. 459–462, 1 out. 2018.

ZHANG, D. Y. et al. Proteomics, pathway array and signaling network-based medicine in cancer. **Cell Division**, v. 4, p. 20, 28 out. 2009.

ZHANG, H. et al. Metabolomic profiling reveals potential biomarkers in esophageal cancer progression using liquid chromatography-mass spectrometry platform. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 491, n. 1, p. 119–125, 9 set. 2017.

ZHANG, Z. et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. **Cancer Research**, v. 64, n. 16, p. 5882–5890, 15 ago. 2004.

ZHAO, Q. et al. Differentially expressed proteins among normal cervix, cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma. **Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico**, v. 17, n. 8, p. 620–631, ago. 2015.

ZHAOJIE, L. et al. Gelsolin-like actin-capping protein has prognostic value and promotes tumorigenesis and epithelial-mesenchymal transition via the Hippo signaling pathway in human bladder cancer. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 11, 29 abr. 2019.

ZHENG, H.-C. et al. Arp2/3 overexpression contributed to pathogenesis, growth and invasion of gastric carcinoma. **Anticancer Research**, v. 28, n. 4B, p. 2225–2232, ago. 2008.

ZHENG, H.-C.; GONG, B.-C. The roles of maspin expression in gastric cancer: a meta- and bioinformatics analysis. **Oncotarget**, v. 8, n. 39, p. 66476–66490, 11 ago. 2017.

ZHENG, R. et al. Cervical cancer systemic inflammation score: a novel predictor of prognosis. **Oncotarget**, v. 7, n. 12, p. 15230–15242, 14 fev. 2016.

ZHOU, G. et al. The role of desmosomes in carcinogenesis. **OncoTargets and therapy**, v. 10, p. 4059–4063, 14 ago. 2017.

ZHOU, H. et al. Prognostic biomarkers of cervical squamous cell carcinoma identified via plasma metabolomics. **Medicine**, v. 98, n. 26, 28 jun. 2019a.

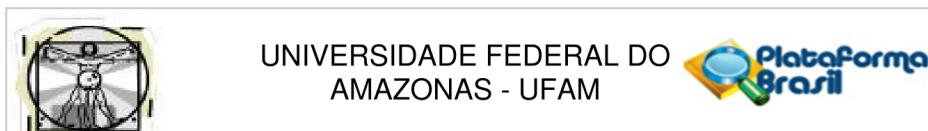
ZHOU, Q. et al. Transgelin 2 overexpression inhibits cervical cancer cell invasion and migration. **Molecular Medicine Reports**, v. 19, n. 6, p. 4919–4926, jun. 2019b.

ZHU, Y.-P. et al. Reactive stroma component COL6A1 is upregulated in castration-resistant prostate cancer and promotes tumor growth. **Oncotarget**, v. 6, n. 16, p. 14488–14496, 30 mar. 2015.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A: Parecer do Comitê de ética em pesquisa – UFAM



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação das características epidemiológicas e moleculares de mulheres tratadas com lesões precursoras do câncer de colo de útero no Amazonas

Pesquisador: Priscila Ferreira de Aquino

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 71342417.4.3002.5020

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Exatas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.464.202

Apresentação do Projeto:

Esse trabalho trata-se de um estudo prospectivo descritivo que almeja avaliar tecidos obtidos por exérese do colo de útero e suas bordas (margem) através de abordagens epidemiológicas e moleculares quanto a presença de possíveis indicadores de modificações relacionadas ao processo de tumorigênese nas lesões precursoras, de pacientes atendidas no centro de referência oncológica do Amazonas. O câncer de colo de útero é considerado um problema de saúde pública pela elevada incidência e mortalidade no contexto mundial. No Brasil, é o terceiro tipo que mais atinge as mulheres, correspondendo a uma frequência de 7,9% do total, sendo a região norte, em especial o estado do Amazonas, um dos maiores em incidência, com uma média superior a nacional. Esta doença geralmente começa a partir dos 25-30 anos e seu desenvolvimento é precedido por neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), que variam de acordo com o grau de anormalidade nas células epiteliais em três tipos: I, II e III. Tais lesões podem tanto regredir como progredir, sendo recomendado o processo de conização, a partir da confirmação por colposcopia ou histologia. Geralmente, o diagnóstico deste tipo de câncer é realizado através do histórico familiar, exames clínicos e biópsia. Um dos principais agentes etiológicos no desenvolvimento dessas neoplasias é o vírus do papiloma humano (HPV). A proteômica e a metabolômica são abordagens que são complementares entre si e que podem auxiliar nesse processo de melhor compreensão do câncer. Estas podem permitir a identificação, caracterização e quantificação de proteínas e metabólitos diferencialmente expressos quando comparado estados patológicos

Endereço: Rua Teresina, 495

Bairro: Adrianópolis

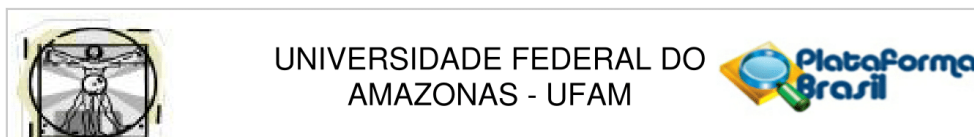
UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

CEP: 69.057-070

E-mail: cep.ufam@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.464.202

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto somos de parecer pela Aprovação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1030611.pdf	21/12/2017 13:17:04		Aceito
Outros	Parecer_aprovacao_FCECON.pdf	21/12/2017 13:15:24	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia_UFAM.pdf	21/12/2017 12:53:59	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia_institucional_ILMD.pdf	21/12/2017 12:53:35	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia_institucional_FCECON.pdf	21/12/2017 12:53:16	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
Cronograma	Novo_cronograma.pdf	21/12/2017 12:52:35	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_Resposta_CEP_UFAM_Final.pdf	21/12/2017 12:51:48	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_Final.pdf	29/09/2017 01:52:31	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
Outros	Questionario.pdf	29/09/2017 00:49:46	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Novo_TCLE_Final.pdf	29/09/2017 00:46:29	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Teresina, 495

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

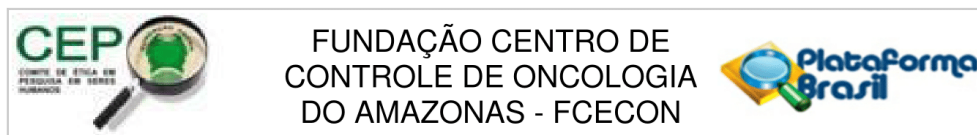
UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

E-mail: cep.ufam@gmail.com

ANEXO B: Parecer do Comitê de ética em Pesquisa – FCECON



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação das características epidemiológicas e moleculares de mulheres tratadas com lesões precursoras do câncer de colo de útero no Amazonas

Pesquisador: Priscila Ferreira de Aquino

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 71342417.4.0000.0004

Instituição Proponente: Diretoria de Ensino e Pesquisa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.372.935

Apresentação do Projeto:

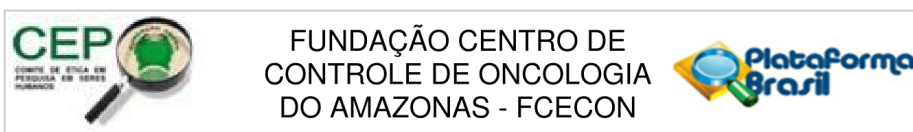
Trata-se de um estudo prospectivo descritivo que almeja avaliar tecidos obtidos por exérese do colo de útero e suas bordas (margem) através de abordagens epidemiológicas e moleculares quanto a presença de possíveis indicadores de modificações relacionadas ao processo de tumorigênese nas lesões precursoras, de pacientes atendidas no centro de referência oncológica do Amazonas

Hipótese 1 e 2 são respectivamente: se as mulheres submetidas a exérese do colo de útero e suas bordas possuem ou não características moleculares epidemiológicas de alterações oncogênicas específicas, do câncer de colo de útero, nas lesões precursoras.

Local do estudo: As amostras serão coletadas na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON), hospital referência nacional em pesquisas oncológicas no estado do Amazonas; sendo este projeto desenvolvido em instituições coparticipantes que apresentaram anuência formal para a realização desse trabalho (Apêndice 1)

Cálculo amostral: Segundo dados da estatística de atendimento na FCECON, são atendidas em média 400 casos de mulheres para tratamento, por ano, de lesões precursoras avançadas (NIC II ou avançadas) de colo de útero ou com câncer invasor. Levando em conta que o número de casos de câncer do colo do útero registrados na FCECON em 2016 foi de 240 casos, e que a população

Endereço: Rua Francisco Orellana, 215 - Planalto - 3º andar
Bairro: S/N **CEP:** 69.040-010
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-4774 **E-mail:** comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br



Continuação do Parecer: 2.372.935

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_962374.pdf	29/09/2017 01:54:45		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_Final.pdf	29/09/2017 01:52:31	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_Resposta_Final.pdf	29/09/2017 01:49:52	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	29/09/2017 00:58:26	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
Outros	Questionario.pdf	29/09/2017 00:49:46	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia_UFAM.pdf	29/09/2017 00:47:08	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Novo_TCLE_Final.pdf	29/09/2017 00:46:29	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_nova.pdf	17/07/2017 10:25:53	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia_institucional_HUGV.pdf	16/07/2017 09:04:32	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia_institucional_FCECON.pdf	14/07/2017 17:55:35	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia_institucional_ICC.pdf	14/07/2017 16:48:26	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia_institucional_UFRJ.pdf	14/07/2017 16:48:04	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia_institucional_ILMD.pdf	14/07/2017 16:47:51	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_Anuencia_Pesquisadores.pdf	14/07/2017 01:17:55	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_anuencia_ambulatorio_FCECON.pdf	13/07/2017 23:17:55	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia_Centro_Cirurgico_FCECON.pdf	13/07/2017 23:17:36	Priscila Ferreira de Aquino	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Rua Francisco Orellana, 215 - Planalto - 3º andar
Bairro: S/N **CEP:** 69.040-010
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-4774 **E-mail:** comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br

Página 08 de 09

Continuação do Parecer: 2.372.935

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 09 de Novembro de 2017

Assinado por:
Paulo José Benevides dos Santos
 (Coordenador)

Página 09 de 09

ANEXO C: Cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen)



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A49A7F6

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	A49A7F6
Usuário:	Fiocruz
CPF/CNPJ:	33.781.055/0001-35
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Vírus do papiloma humano

Título da Atividade: **Avaliação das características epidemiológicas e moleculares de mulheres tratadas com lesões precursoras do câncer de colo de útero no Amazonas**

Equipe

Priscila Ferreira de Aquino	ILMD/FIOCRUZ
Kátia Luz Torres Silva	FCECON
Monique Freire dos Reis	UFAM
Luiz Carlos de Lima Ferreira	UFAM
Maria Jacirema Ferreira Gonçalves	ILMD/FIOCRUZ
Paulo Costa Carvalho	ICC/FIOCRUZ
Maria da Glória da Costa Carvalho	UFRJ
Gilberto Barbosa Domont	UFRJ
Fábio César Sousa Nogueira	UFRJ
Juliana de Saldanha da Gama Fischer	ICC/FIOCRUZ
Valquiria do Carmo Alves Martins	FCECON
Marlon Dias Mariano dos Santos	ICC/FIOCRUZ
Luana Quadros de Souza Leão	UFAM
Jéssica Kelly Moraes da Silva	ILMD/FIOCRUZ
Marissa Braga dos Anjos	ILMD/FIOCRUZ

Parceiras Nacionais

34.570.820/0001-30 / Fundação Centro De Controle De Oncologia
 33.663.683/0001-16 / Universidade Federal do Rio de Janeiro
 33.781.055/0065-08 / Instituto Carlos Chagas
 04.378.626/0001-97 / Fundação Universidade do Amazonas

Data do Cadastro: 08/11/2018 18:05:34
 Situação do Cadastro: **Concluído**





Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 19:20 de 25/11/2018.

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

APÊNDICES

APÊNDICE A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Nós, Priscila Ferreira de Aquino, Kátia Luz Torres Silva, Valquíria Carmo dos Alves Martins e demais pesquisadores, convidamos à senhora para participar do estudo chamado “**Avaliação das características epidemiológicas e moleculares de mulheres tratadas com lesões precursoras do câncer de colo de útero no Amazonas**”, que trarão novos conhecimentos que possam ajudar a compreender o perfil das pacientes tratadas com esse tipo de doença na nossa região.

- a) O objetivo desse estudo é descrever os possíveis fatores associados ao desenvolvimento das lesões desse tipo de câncer em mulheres submetidas à cirúrgica de retirada do colo de útero e suas bordas (margem) em um hospital especializado em oncologia do Amazonas (FCECON).
- b) Caso a senhora aceite participar da pesquisa, deverá responder a um questionário, o qual será aplicado por um membro da equipe deste estudo e permitir que os pesquisadores acessem o seu prontuário para buscar maiores informações clínicas do seu caso.
- c) Será separada uma amostra de sangue de 5 mL, que será coletado juntamente com as amostras para realização de exames laboratoriais pré-operatórios, solicitadas pelo seu médico; essa coleta será realizada no laboratório de análises clínicas da FCECON por profissional de saúde especializado.
- d) No momento da cirurgia, serão coletadas amostras da lesão e da área próxima a lesão. Este material será utilizado para a pesquisa, sendo a coleta feita pelo seu médico.
- e) É possível que durante a sua participação na pesquisa a senhora experimente algum desconforto ou constrangimento ao responder a entrevista e o questionário, devido ao fato de poder lembrar-se de momentos tristes e difíceis da doença. É importante lembrar que a abordagem será feita por profissionais da área da saúde, os quais ao perceberem qualquer impacto psicológico gerado ao senhor, o encaminharão ao setor de psicologia da unidade.
- f) Os benefícios gerados com essa pesquisa são indiretos, a médio e longo prazo para os participantes desse trabalho. Pois consistem no aumento de informações sobre essa doença e que possam futuramente ajudar no diagnóstico e tratamento dos pacientes que venham a desenvolver esta enfermidade.
- g) Sua identidade pessoal e/ou profissional será excluída de todos e quaisquer produtos da pesquisa para fins de publicação científica. E, os pesquisadores garantem o sigilo dos dados.
- h) A pesquisadora Priscila Ferreira de Aquino (número disponível para contato: 3621-2333) responsável pelo projeto estará disponível nesse número de telefone ou no Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), para esclarecimento de qualquer dúvida que a senhora possa ter ou para dar qualquer informação que queira referente à sua participação no estudo, antes, durante ou depois do encerramento do projeto.
- i) Os materiais coletados da senhora serão utilizados exclusivamente para atender os objetivos da pesquisa. As amostras colhidas (amostras da peça cirúrgica e do sangue) nesse trabalho serão armazenadas em biorrepositórios primeiramente, que se destinam a ser um tipo de depósito onde as amostras ficarão armazenadas no tempo de realização deste projeto de pesquisa; cuja guarda ficará com o pesquisador principal Dra. Priscila Ferreira de Aquino e de responsabilidade institucional da FCECON, permanecendo nesse depósito o tempo programado para realização do trabalho. Caso haja necessidade, esta poderá ser

prolongada mediante justificativa e aprovação do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa). Seu material biológico será armazenado sobre um sistema seguro de identificação, que garante o sigilo, o respeito à confidencialidade e à recuperação dos seus dados, para o fornecimento de informações de seu interesse ou para a obtenção de consentimento específico para utilização em nova pesquisa.

Por isso torna-se necessário que marque qualquer alternativa abaixo, que condiz com sua participação nesse estudo:

() Necessidade de novo consentimento a cada pesquisa (a cada nova pesquisa o pesquisador responsável entrará em contato para adquirir novo termo de consentimento livre e esclarecido).

() Dispensa de novo consentimento a cada pesquisa (seu material biológico poderá ser utilizado para pesquisa futuras sem a necessidade de novo termo de consentimento livre e esclarecido).

j) A sua participação no estudo é voluntária, não recebendo qualquer benefício financeiro. Você pode a qualquer momento decidir não fazer mais parte da pesquisa e retirar seu consentimento. Essa decisão não prejudicará de forma alguma seu tratamento e acompanhamento na FCECON.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza, objetivo e importância do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi tratou de riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Assino o presente documento em duas vias de igual teor e forma, ficando uma em minha posse. Sendo assim, eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Manaus, _____ de _____ de _____.

Nome e Assinatura do sujeito da pesquisa

Nome e Assinatura do pesquisador responsável



Impressão digital caso não saiba assinar

APÊNDICE B: Questionário

QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO DO PACIENTE

Título do projeto: Avaliação das características epidemiológicas e moleculares de mulheres tratadas com lesões precursoras do câncer de colo de útero no Amazonas

Identificação no Projeto _____

Dados do estudo

1. Data da abordagem para o estudo: ____/____/____
2. Responsável pela coleta de dados: _____

Dados Relacionados à Biologia do Indivíduo

3. Iniciais da paciente: _____
4. Endereço contato: _____
5. Telefone: _____
6. Celular: _____
7. Data de Nascimento: ____/____/____
8. Município de Nascimento: _____
9. Estado: _____
10. Raça: () Branca () Parda () Negra () Indígena () Oriental
11. Estado civil: () Solteira () Casada () Viúva () União estável () Divorciada

Dados Sócio-demográficos

12. Escolaridade: () Analfabeto () Fundamental incompleto () Fundamental completo () Médio incompleto () Médio completo () Superior incompleto () Superior completo
13. Qual o número de anos de escolaridade? _____
14. Ocupação: _____
15. Renda familiar: () 1 salário mínimo () 2 – 3 salários mínimos () 4-6 salários mínimos () ≥ 7 salários mínimos
16. Qual o valor da renda familiar? _____

Dados comportamentais

17. Com qual idade iniciou a atividade sexual: _____
18. Faz uso de camisinha na relação sexual: () Nunca () as vezes () Sempre
19. Usa ou usou algum método anticoncepcional (exceto camisinha)? () Sim () Não
() Pílula (anticoncepcional oral) () Anticoncepcional injetável
() Dispositivo intra-uterino (DIU) () Tabela () Coito interrompido
() Outro. Especificar: _____
20. Quanto tempo? _____
21. Número de parceiros sexuais em um ano: _____
22. Quantos parceiros sexuais já teve ao longo de sua vida: _____
23. Número de filhos (paridade): _____
24. Idade do primeiro parto: _____

25. Qual tipo de parto: () Normal () Cesariana
 26. Quantos partos normais? _____ 27. Quantos partos por cesariana? _____
 28. Teve algum aborto: () Sim () Não 29. Quantos: _____

Dados epidemiológicos

30. Já é menopausada? () Sim () Não 31. Há quanto tempo? _____
 32. Em caso positivo de menopausada, faz uso de terapia de reposição hormonal?
 () Sim () Não
 33. Se sim, qual(is): _____
 34. Qual foi a data ou ano da sua última menstruação? ____/____/____
 35. Já apresentou doenças sexualmente transmissíveis: () Sim () Não () Não sabe
 36. Se sim, qual(is): _____
 37. Já apresentou: Corrimento vaginal? () Sim () Não () Não sabe
 Verruga? () Sim () Não () Não sabe
 Ferida? () Sim () Não () Não sabe
 38. Realiza exame preventivo de câncer de colo de útero, com que frequência?
 () Nunca realizou () 6 em 6 meses () 1 x ao ano () a cada 2 anos () mais de 3 anos ()
 Não sabe
 39. Quais os motivos pelos quais não realizou o exame?
 () Inibição () Medo () Falta de tempo () Dificuldade de acesso
 () Outros Especificar: _____
 40. Já apresentou algum tipo de alteração nos preventivos anteriores?
 () Sim () Não Qual? _____
 41. Tem algum familiar que já apresentou câncer de colo de útero?
 () Sim () Não Quem? _____
 42. Teve algum familiar que já apresentou outro tipo de câncer?
 () Sim () Não Qual tipo? _____
 43. A senhora fuma ou já fumou? () Sim () Não
 44. Se sim, há quanto tempo? _____
 45. Qual a frequência do uso de cigarro? _____
 46. Faz uso de outros derivados do tabaco? () Sim () Não
 47. Se sim, qual a frequência? _____
 48. A senhora bebe ou já bebeu? () Sim () Não
 49. Se sim, há quanto tempo? _____
 50. Qual frequência? _____
 51. Faz dieta? () Sim () Não 52. Há quanto tempo? _____
 53. Faz uso de suplementação alimentícia? () Sim () Não
 54. Se sim, há quanto tempo? _____
 55. Faz uso de suplementação hormonal? () Sim () Não
 56. Se sim, há quanto tempo? _____
 57. Conhecimentos à cerca do HPV:
 () Nunca ouviu falar sobre HPV
 () Informação sobre HPV em mídia eletrônica ou impressa

102. Estadiamento FIGO: _____

103. Estadiamento TMN: _____

Dados de atendimento da rede oncológica (FCECON) após o diagnóstico de progressão da doença:

104. Realizou seguimento clínico da doença na FCECON? () Sim () Não

105. Como avalia o atendimento recebido durante o seguimento clínico?

() Excelente () Ótimo () Bom () Regular () Péssimo

106. Teve facilidade em agendar o tratamento proposto após o diagnóstico de progressão da doença?

() Sim () Não

107. Quanto meses teve que aguardar pela marcação/realização do tratamento proposto? _____

108. Qual foi o tempo (dias ou meses) entre a primeira biópsia e o tratamento após a progressão (cirurgia, quimioterapia, radioterapia)? _____

109. Em que tipo de instituição foi realizado o exame citológico:

() Pública () Particular

110. Em que tipo de instituição foi realizado o exame histológico:

() Pública () Particular

Outras informações relevantes que queria mencionar:

Local:

Data:

APÊNDICE C: Características gerais das mulheres envolvidas no estudo metabólico

Pacientes	Amostras	Siglas	Idade	Tipo de amostra	Diagnóstico Histopatológico
1	1	T3	63	Lesão	NIC 3
	2	M3		Margem	
2	3	T3	45	Lesão	NIC 3
	4	M3		Margem	
3	5	T3	43	Lesão	NIC 3
	6	M3		Margem	
4	7	T3	58	Lesão	NIC 3
	8	M3		Margem	
5	9	T3	55	Lesão	NIC 3
	10	M3		Margem	
7	11	T3	29	Lesão	NIC 3
	12	M3		Margem	
8	13	T3	54	Lesão	NIC 3
	14	M3		Margem	
10	15	T3	34	Lesão	NIC 3
	16	M3		Margem	
11	17	T3	35	Lesão	NIC 3
	18	M3		Lesão	
12	19	T3	42	Margem	NIC 3
	20	M3		Lesão	
13	21	T3	47	Margem	NIC 3
	22	M3		Lesão	
14	23	T3	43	Margem	NIC 3
	24	M3		Lesão	
15	25	T3	28	Margem	NIC 3
	26	M3		Lesão	
16	27	T3	26	Margem	NIC 3
	28	M3		Lesão	
17	29	T3	66	Margem	NIC 3
	30	M3		Lesão	
18	31	T3	44	Margem	NIC 3
	32	M3		Lesão	
19	33	T3	42	Margem	NIC 3
	34	M3		Lesão	
20	35	T3	35	Margem	NIC 3
	36	M3		Lesão	
21	37	T3	30	Margem	NIC 3
	38	M3		Lesão	
22	39	T3	29	Margem	NIC 3
	40	M3		Lesão	

23	41	T3	43	Margem	NIC 3
	42	M3		Lesão	
24	43	T3	61	Margem	NIC 3
	44	M3		Lesão	
25	45	T3	42	Margem	NIC 3
	46	M3		Lesão	
26	47	T3	72	Margem	NIC 3
	48	M3		Lesão	
27	49	T3	37	Lesão	NIC 3
	50	M3		Margem	
28	51	T3	50	Lesão	NIC 3
	52	M3		Margem	
29	53	T3	39	Lesão	NIC 3
	54	M3		Margem	
30	55	T2	40	Lesão	NIC 2
	56	M2		Margem	
32	57	T3	46	Lesão	NIC 3
	58	M3		Margem	
33	59	T3	42	Lesão	NIC 3
	60	M3		Margem	
34	61	T3	53	Lesão	NIC 3
	62	M3		Margem	
35	63	T3	21	Lesão	NIC 3
	64	M3		Margem	
36	65	T3	52	Lesão	NIC 3
	66	M3		Margem	
37	67	T3	51	Lesão	NIC 3
	68	M3		Margem	
38	69	T3	72	Lesão	NIC 3
	70	M3		Margem	
39	71	T2	25	Lesão	NIC 2
	72	M2		Margem	
40	73	T3	44	Lesão	NIC 3
	74	M3		Margem	
41	75	T2	46	Lesão	NIC 2
	76	M2		Margem	
42	77	T2	37	Lesão	NIC 2
	78	M2		Margem	
43	79	T2	42	Lesão	NIC 2
	80	M2		Margem	
44	81	T2	36	Lesão	NIC 2
	82	M2		Margem	
45	83	T2	39	Lesão	NIC 2
	84	M2		Margem	
46	85	T2	41	Lesão	NIC 2

	86	M2		Margem	
47	87	T3	54	Lesão	NIC 3
	88	M3		Margem	
48	89	T2	42	Lesão	NIC 2
	90	M2		Margem	
49	91	T2	25	Lesão	NIC 2
	92	M2		Margem	
50	93	T2	39	Lesão	NIC 2
	94	M2		Margem	
51	95	T2	41	Lesão	NIC 2
	96	M2		Margem	
52	97	/	48	/	NIC 2
	98	M2		Margem	