

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Expressão da ecto-5'-nucleotidase e sua relação com  
Papiloma Vírus Humano em pacientes com e sem lesões  
intraepiteliais escamosas de baixo e alto grau**

TARISSA TORRES MOREIRA

Orientador: Ricardo dos Reis

Porto Alegre

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Expressão da ecto-5'-nucleotidase e sua relação com  
Papiloma Vírus Humano em pacientes com e sem lesões  
intraepiteliais escamosas de baixo e alto grau**

**TARISSA TORRES MOREIRA**

**Orientador: Ricardo dos Reis**

**Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós Graduação em  
Medicina: Ciências Médicas, UFRGS,  
como requisito para obtenção do  
Título de Mestre**

Porto Alegre

2013

# DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2013

## FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação  
Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Torres Moreira, Tarissa

Expressão da ecto-5'-nucleotidase e sua relação  
com Papiloma Vírus Humano em pacientes com lesões  
intraepiteliais escamosas de baixo e alto grau /

Tarissa Torres Moreira. -- 2013.

59 f.

Orientador: Ricardo dos Reis.

Coorientadores: Diogo André Pilger, Andréia  
Buffon.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Ecto-5'-nucleotidase. 2. Câncer cervical. 3.  
Lesões intraepiteliais escamosas cervicais. 4.  
Papiloma Vírus Humano. I. dos Reis, Ricardo, orient.  
II. Pilger, Diogo André, coorient. III. Buffon,  
Andréia, coorient. IV. Título.

## AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas pela oportunidade de realizar o programa em uma Universidade pública.

Ao meu orientador Dr. Ricardo dos Reis por ter aberto as portas desde o início, pela confiança e motivação, estas que em constantes momentos foram fundamentais para que eu conseguisse realizar esse trabalho.

Ao meu co-orientador Diogo André Pilger, pessoa fundamental na realização deste projeto, pelo constante apoio, amizade, disponibilidade por estar sempre pronto a ajudar, me incentivando em momentos importantes.

À minha co-orientadora Andréia Buffon, pela preocupação, ensinamentos e por me manter sempre atenta à importância deste trabalho.

À professora Luciane Calil, idealizadora deste projeto.

Aos colegas do Laboratório Weinmann, pela compreensão pelas trocas de horários, ausências eventuais e pelo constante apoio.

Aos colegas do Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, especialmente ao Camilo D'amore pela ajuda incansável com o Citômetro de Fluxo e à Denise Wolhfmeister pelo apoio, amizade, disposição e ajuda com as análises de PCR.

Aos professores, funcionários, residentes e doutorandos do ambulatório de Ginecologia Oncológica e Patologia Cervical do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo acolhimento nas tardes de terças e sextas-feiras, e pela compreensão e contribuição para a coleta de amostras.

Às minhas amigas, pelo apoio fundamental em todos os momentos

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Tessa e Ari, pelo incentivo à educação, por acreditarem sempre em mim, e por me transmitirem muito amor, paz e conforto nos momentos de dúvida.

Ao meu marido Samuel, por estar sempre ao meu lado, pelo amor, paciência, incentivo e senso de humor nos momentos difíceis.

*“A possibilidade de realizarmos um sonho é o que torna a vida interessante.”*

*(Paulo Coelho)*

## SUMÁRIO

<b>Lista de Abreviaturas e siglas.....</b>	<b>9</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>10</b>
<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>11</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>12</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>13</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>14</b>
<b>Revisão da Literatura.....</b>	<b>16</b>
<b>1. Câncer cervical.....</b>	<b>16</b>
<b>2. Papiloma Vírus Humano.....</b>	<b>18</b>
<b>3. Métodos Diagnósticos.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Metodologias citopatológicas.....</b>	<b>22</b>
3.1.1 Citologia cérvico-vaginal.....	22
3.1.2 Colposcopia.....	23
3.1.3 Histopatologia cérvico-vaginal.....	23
<b>3.2 Metodologias moleculares.....</b>	<b>24</b>
3.2.1 Reação em cadeia da polimersase.....	24
<b>4. Biomarcadores.....</b>	<b>25</b>
<b>5. Sistema Purinérgico.....</b>	<b>26</b>
<b>5.1 Receptores purinérgicos.....</b>	<b>27</b>
<b>5.2 Enzimas do sistema purinérgico.....</b>	<b>28</b>
<b>5.3 Ecto-5'-nucleotidase.....</b>	<b>29</b>

<b>Justificativas.....</b>	<b>31</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>32</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>33</b>
<b>Artigo Científico.....</b>	<b>39</b>
<b>Considerações finais.....</b>	<b>59</b>



## Lista de abreviaturas e siglas

**ADP:** adenosina difosfato

**AMP:** adenosina monofosfato

**APs:** fosfatases alcalinas

**ATP:** adenosina trifosfato

**CC:** câncer de colo do útero invasor

**CD25:** *cluster of differentiation 25*

**CD73:** *cluster of differentiation 73*

**CÉLULAS NK:** células *natural killer*

**DATASUS:** Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**E-5'-NT:** ecto-5'-nucleotidase

**ER:** receptor de estrógeno

**HPV:** papiloma vírus humano

**HPV-HR:** HPV de alto risco ("*high risk*")

**HPV-LR:** HPV de baixo risco ("*low risk*")

**HSIL:** lesão intra-epitelial escamosa de alto grau

**LSIL:** lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau

**NIC:** neoplasia intra-epitelial escamosa cervical

**PCR:** *polimerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

**VLP:** *virus like particles*

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão da Literatura

- Figura 1:** Incidência do CC no Brasil: número de casos por 100.000 habitantes... 14
- Figura 2:** Patogênese da infecção por HPV.....17
- Figura3:** Representação esquemática da estrutura do genoma do HPV.....18
- Figura 4:** Representação esquemática das enzimas constituintes do sistema purinérgico acopladas à membrana plasmática e seus substratos..... 28

### Artigo científico

- Figure 1:** Expression of E-5'-NT by flow cytometry in different groups ..... 57
- Figure 2:** Expression of E-5'-NT by flow cytometry and its relationship with HPV.....58

## LISTA DE TABELAS

### Artigo científico

<b>Table 1:</b> Age, parity, smoking, sexual partners and first sexual intercourse data in relation to squamous intraepithelial lesions.....	56
<b>Table 2:</b> E-5'-NT median in different groups of cervical lesions.....	56

## RESUMO

**Objetivo do estudo:** Avaliar a expressão da enzima ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT) e a sua relação com a presença de HPV em pacientes negativos para lesão escamosa, pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau e lesão intra-epitelial escamosa de alto grau. **Métodos:** Um total de 57 pacientes foi selecionado a partir de julho 2012 a janeiro de 2013 atendidas no ambulatório de Ginecologia Oncológica e Patologia Cervical do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Elas foram divididas em três grupos: negativo para lesão intra-epitelial escamosa (NILM), lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL) e lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HSIL). A pesquisa de HPV foi realizada por PCR convencional e a expressão da enzima foi determinada por citometria de fluxo. Também foi avaliado na amostra a média de idade, paridade, sexarca e frequência de tabagismo. **Resultados:** A prevalência de HPV analisado por PCR na amostra estudada foi de 8,7%. No grupo controle (NILM), nenhuma das pacientes teve teste para HPV positivo. No grupo LSIL, 18.8% tiveram HPV detectado na amostra e, no grupo HSIL, 11.1%. Na análise da enzima E-5'-NT realizada por citometria de fluxo, a mediana de positividade foi 1,28% (intervalo interquartil: 0,31 a 3,61). Quando comparamos as distribuições da enzima entre os grupos com e sem lesão, não encontramos diferença estatisticamente significativa ( $P=0,182$ ), nem associação com a presença de HPV ( $P=0,96$ ). **Conclusão:** Considerando que, no presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas de expressão da E-5'-NT entre pacientes sem lesão intra-epitelial escamosa cervical quando comparadas com os grupos LSIL e HSIL, e nenhuma associação entre a expressão da enzima e a presença de DNA de HPV, maiores estudos, com uma maior população amostral, incluindo casos de câncer de colo uterino invasor, são necessários para elucidar estas relações.

**Palavras-chave:** câncer cervical, ecto-5'-nucleotidase, HPV, lesão intra-epitelial escamosa.

## ABSTRACT

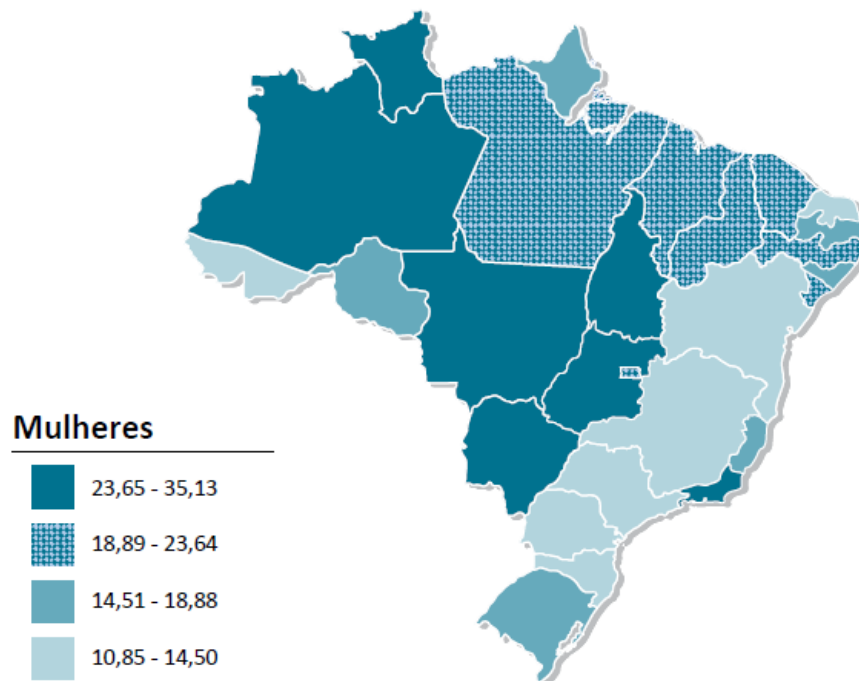
**Aim of the study:** Evaluate the expression of the enzyme ecto-5'-nucleotidase (5'-NT-E) and its relationship with the presence of HPV in patients who were negative for squamous intraepithelial lesion or malignancy and patients with low and high grade squamous intraepithelial lesions. **Methods:** A total of 57 patients were selected from July 2012 to January 2013 at Gynecology Oncology and Cervical Pathology, located at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. They were subdivided into 3 groups: negative for squamous intraepithelial lesion (NILM), low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) and high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL). HPV test was performed by standard PCR methodology and enzyme expression was determined by flow cytometry. Mean age, parity, age at first sexual intercourse and frequency of smoking were also assessed in the sample. **Results:** The prevalence of HPV was 8.5%. In the control group (NLPM) none of the patients had a positive test for HPV. In LSIL group, 18.8% were detected with HPV and in HSIL group, 11.1%. In the E-5'-NT analysis the median of enzyme positivity was 1.28% (interquartile range: 0.31 to 3.61). When comparing the distribution of the enzyme between the groups with and without lesions, we found no statistically significant difference ( $P = 0.182$ ) neither HPV association ( $P = 0.96$ ). **Conclusion:** In the present study, we found no significant differences in the expression of E-5'-NT enzyme among patients without squamous intraepithelial cervical lesions, LSIL and HSIL pap smears, and no association between the expression of the enzyme and the presence of HPV DNA. Further studies with a larger sample population, including cases of invasive cervical carcinoma, are needed to elucidate these relationships.

**Keywords:** Cervical cancer, ecto-5'-nucleotidase, HPV infection, squamous intraepithelial lesions.

## INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino invasor (CC) e todas as lesões precursoras representam um importante papel na saúde da mulher em todo o mundo (Malinowski 2007). O CC é o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres no mundo e estima-se que surjam em torno de 493.000 novos casos por ano no mundo com aproximadamente 270.000 mortes (Wang 2007; Dalstein, Merlin et al. 2009; Nath and Thappa 2009). Em países em desenvolvimento como o Brasil, é o tipo de neoplasia que mais tem aumentado, correspondendo a 25% das neoplasias femininas (Burd 2003). Conforme dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) relativo à incidência de CC, no Rio Grande do Sul eram esperados até 18 novos casos para cada 100.000 habitantes no ano de 2012 (figura 1).

Figura1: Incidência do CC no Brasil: número de casos por 100.000 habitantes



Fonte:(INCA2012)

Diversos trabalhos evidenciam claramente que certos genótipos do Papiloma Vírus Humano (HPV) estão etiologicamente relacionados a praticamente 99,7% dos casos de CC (Munoz, Bosch et al. 2003). Adenocarcinomas da cérvix uterina também são relacionados ao vírus, porém a correlação é menos evidente e também dependente da idade dos pacientes (Burd 2003). Aproximadamente 40% das mulheres sexualmente ativas são infectadas pelo HPV, com uma curva de distribuição etária com picos aos 35-39 e 60-64 anos, provavelmente como resultado da reativação de infecções latentes ou possibilidade de falha em algum tratamento prévio (Rosa 2007).

A detecção de lesões precursoras do CC pode poupar a vida da paciente, visto que a taxa de cura depende fortemente do estágio em que se encontra a doença ao diagnóstico. Em virtude do mecanismo oncogênico do HPV, proteínas relacionadas ao seu ciclo celular têm sido investigadas tanto por técnicas citológicas quanto histológicas, por seu valor prognóstico. Além disso, pesquisas indicam que rotas de sinalização, como o sistema purinérgico, estão envolvidas na gênese tumoral em vários carcinomas (Gorini, Gatta et al. 2013). As enzimas que compõem este sistema participam de uma cascata enzimática que leva à degradação de AMP ao nucleosídeo adenosina (Kruger, Thompson et al. 1991; Gorini, Gatta et al. 2013) e, portanto, um aumento na concentração deste, podendo estimular o desenvolvimento e a progressão tumoral (Jin, Fan et al. 2010; Stagg, Divisekera et al. 2011; Beavis, Stagg et al. 2012)

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1. Câncer de colo uterino invasor (CC)

O câncer de colo uterino invasor (CC) é o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres no mundo. Estima-se que surjam em torno de 493.000 novos casos por ano com aproximadamente 270.000 mortes (Munoz, Bosch et al. 2003; Insinga, Dasbach et al. 2007; Mayrand, Duarte-Franco et al. 2007; Wang 2007; Keam and Harper 2008; Dalstein, Merlin et al. 2009; Nath and Thappa 2009). Em busca prospectiva no site do DATASUS para avaliação dos dados de prevalência, a partir de 2006 até o final de 2012, foram identificados 128.000 novos casos CC no Rio Grande do Sul. No Brasil, somente no ano de 2012, foram 26.956 casos de seguimento informado de lesão Intraepitelial de alto grau, a lesão precursora do CC. (DATASUS2012)

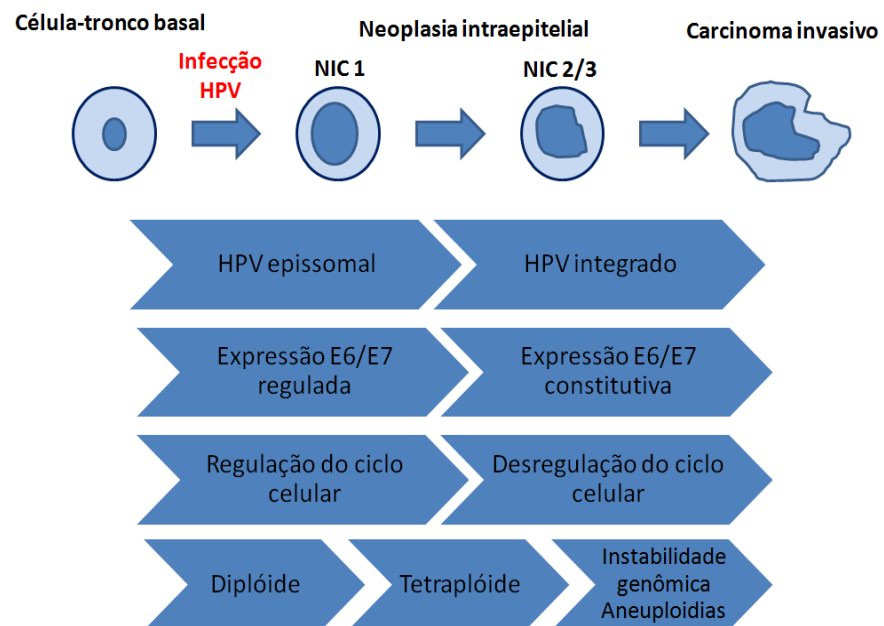
Apesar da complexidade do tratamento do CC, de acordo com a estratificação de risco para recorrência e diretrizes utilizadas no tratamento (histerectomia radical com linfadenectomia pélvica seguida por tratamento adjuvante de radioterapia e quimioterapia), mais de 40% das pacientes irão apresentar recidiva tumoral. Além disso, após o desenvolvimento de novas vacinas para prevenir o desenvolvimento do HPV, seu agente etiológico mais frequente, o efeito protetor somente acontece em grupos especiais de pacientes (Ancuta, Ancuta et al. 2009).

Uma série de alterações displásicas, desde a infecção pelo HPV até a progressão maligna das lesões pré-cancerosas até o CC ocorre por um período de muitos anos (Hoory, Monie et al. 2008). O grau em que o epitélio escamoso é substituído pelas células neoplásicas determina a severidade das lesões. Nas displasias mais severas, as células basais substituem toda a espessura do epitélio lesionado. Esfregaços cervicais de epitélios displásicos revelam células esfoliadas da camada basal e presença de coilócitos, que são células com núcleo enrugado, apresentando membrana nuclear irregular, rodeado por um halo claro, como resultado da infecção (Hoory, Monie et al. 2008).



Quando há falha do sistema imunológico em eliminar uma infecção persistente por HPV, a transformação maligna do epitélio infectado pode ocorrer. No entanto, essa transformação pode levar décadas. Enquanto nas lesões pré-cancerosas a maioria dos genomas virais persiste em forma episossomal, nas lesões de alto grau, o genoma do HPV está frequentemente integrado ao genoma da célula hospedeira (Consolaro and Maria-Engler 2012). O HPV infecta as células da camada basal do tecido subjacente à cérvix uterina. A diferenciação dessas células infectadas durante a migração das células através do epitélio estratificado cervical está associada com a replicação viral do HPV e reinfeção das células. Durante esse processo, inúmeras mudanças celulares ocorrem, incluindo a desregulação do ciclo celular, ativação da proliferação, replicação do DNA, ativação da transcrição e instabilidade genômica, conforme apresentado na figura 2 (Malinowski 2005).

Figura 2: Patogênese da infecção por HPV



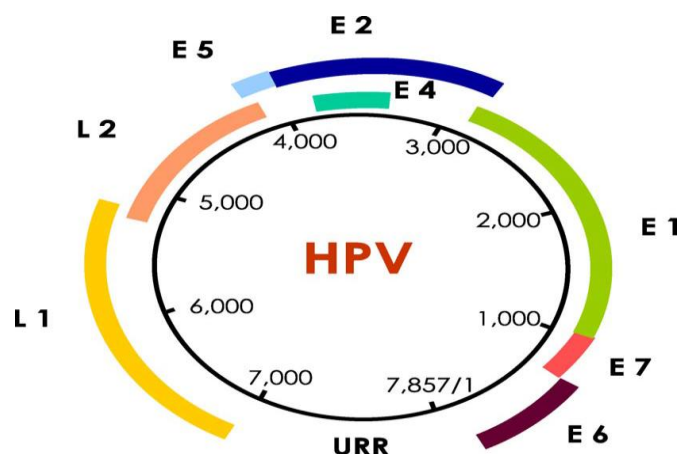
(Fonte: adaptado de Malinowski, 2005)

## 2. Papiloma Virus Humano (HPV)

O HPV é um vírus não envelopado que apresenta a capacidade de infectar tecidos epiteliais humanos, incluindo pele e mucosas (mucosa ano-genital, mucosa oral e cavidades). A infecção genital é transmitida diretamente por contato sexual, indiretamente por contato com objetos contaminados e raramente por transmissão vertical (Nath and Thappa 2009).

O genoma do HPV consiste em uma dupla fita de DNA circular que contém aproximadamente 7900 pares de base com 8 a 9 janelas de leitura (*open reading frame*) e uma região regulatória. O vírus não sintetiza nenhuma enzima, assim, depende do hospedeiro para completar seu ciclo de vida, sendo hermeticamente ligado ao programa de diferenciação da célula epitelial infectada (Nath and Thappa 2009). O HPV possui duas proteínas regulatórias chamadas proteínas precoces (*early*) E1 e E2, três importantes oncogenes E5, E6 e E7 e duas proteínas do capsídeo, tardias (*late*) L1 e L2 (Loomis, Pastore et al. 2009; Rapose 2009; Consolaro and Maria-Engler 2012). A organização gênica do HPV está representada esquematicamente na figura 3. As proteínas virais precoces são expressas nas células basais infectadas e dentro das camadas epiteliais mais baixas. Quando as células infectadas alcançam a superfície, a produção das proteínas tardias permite o desprendimento dos virions maduros (Nath and Thappa 2009).

Figura 3: Representação esquemática da estrutura do genoma do HPV.



(Fonte: Muñoz, 2006)

Os oncogenes E6 e E7 são os responsáveis pela transformação maligna das células infectadas, interferindo na função das proteínas-chave da supressão tumoral através dos genes p53 e retinoblastoma (pRb), prolongando o ciclo celular através da supressão da apoptose e contribuindo para o desenvolvimento das lesões associadas ao HPV (Munoz, Castellsague et al. 2006; Nath and Thappa 2009; Rapose 2009).

Baseados na sequência do DNA viral são conhecidos mais de 200 tipos de HPV, dos quais pelo menos 40 têm tropismo especialmente pela mucosa ano-genital (Munoz, Bosch et al. 2003; Munoz, Castellsague et al. 2006; Dehn, Torkko et al. 2007). São classificados como baixo risco ou alto risco, baseados no seu potencial em provocar lesões malignas (Munoz, Bosch et al. 2003; Stevens, Garland et al. 2007; Hoory, Monie et al. 2008). Dessa maneira, entre os tipos de alto risco (HPV-HR) temos o 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, e 82. Já os tipos 26, 53 e 66 são classificados como “provavelmente de alto risco” (Munoz, Bosch et al. 2003; Stevens, Garland et al. 2007). Doze tipos (6,11,40,42,43,44,54,61,70,72,81 e CP6108) são classificados como baixo risco (HPV-LR) e três tipos (34, 57 e 83) são associados a um risco indeterminado (Munoz, Bosch et al. 2003).

A ligação entre infecções genitais pelo HPV e o CC foi inicialmente apresentada na década de 1980, pelo virologista alemão Harold zur Hausen, que em 2008 recebeu o prêmio Nobel em Medicina por este achado. A partir dessa data, uma evidente relação entre o HPV e o CC foi estabelecida, sendo atualmente considerada maior, por exemplo, do que a existente entre o fumo e o câncer de pulmão (Burd 2003). A infecção persistente por HPV de alto risco (HPV-HR) tem sido demonstrada como um fator causal necessário para o desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial cervical e potencial progressão ao CC (Lee, Vigliotti et al. 2007; Stevens, Garland et al. 2007; Keam and Harper 2008). Na maior parte dos casos de CC, têm sido encontrados genótipos de HPV-HR, com proporções decrescentes encontradas entre lesões de alto risco e baixo risco, respectivamente. Muitas infecções por HPV são transitórias e assintomáticas e são eliminadas pelo sistema imunológico do hospedeiro sem conduzir a anormalidades celulares (Stevens, Garland et al. 2007).

Um grande percentual de mulheres adquire uma nova infecção por HPV a cada ano sendo que em mulheres mais velhas é mais comum a persistência da infecção e o desenvolvimento de uma lesão cancerosa. Estudos epidemiológicos têm mostrado que o HPV 16 e o HPV 18 são os tipos mais comuns, estando presentes em infecções simples ou múltiplas em até 70% dos cânceres cervicais invasivos (Hoory, Monie et al. 2008; Keam and Harper 2008). O HPV 16 e/ou 18 são encontrados em 45% das lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (NIC2 ou 3) e o HPV 16 está presente em aproximadamente 25% das lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (NIC1). O HPV 16 é a causa mais prevalente de câncer cervical, ocorrendo em 55% dos carcinomas escamosos e 31% dos adenocarcinomas (Burd 2003).

Já o HPV 18, causa 12% dos carcinomas escamosos, com um adicional de 38% dos adenocarcinomas. Seis outros tipos de HPV (45, 31, 33, 52, 58 e 35) são os responsáveis por 19% dos cânceres cervicais, e desses os mais importantes são os tipos 45 e 31, que são encontrados em 10% dos casos. Até hoje, o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra o HPV estão focadas nos tipos 16 e 18, 11 e 6 (Keam and Harper 2008).

Vários outros fatores provavelmente estão envolvidos na carcinogênese: (1) Fatores ambientais ou exógenos, incluindo contraceptivos hormonais, fumo, paridade e co-infecção com outros agentes transmitidos sexualmente; (2) Fatores virais, como infecção por tipos específicos, co-infecção com outros tipos de HPV, HPV variantes, carga viral e integração viral; (3) Fatores do hospedeiro, como hormônios endógenos, fatores genéticos e outros fatores relacionados à resposta imunológica (Munoz, Castellsague et al. 2006).

A relação causal entre infecção persistente com HPV de alto risco e câncer cervical tem resultado no desenvolvimento de diversos sistemas de detecção para o vírus. O uso de testes para identificação da presença de HPV tem sido sugeridos como triagem primária e o teste de Papanicolaou como seguimento para o tratamento de neoplasia intraepitelial cervical. A presença de DNA de HPV-HR identifica mulheres que tem um risco particular de progressão ao câncer cervical. Entretanto, pela alta prevalência de infecções transitórias, a detecção viral tem um pobre valor preditivo positivo para o CC (Boulet, Benoy et al. 2009).

Diversos estudos têm mostrado que testes para detecção de HPV-HR, utilizados como uma ferramenta adjunta à citologia podem melhorar a eficácia dos programas de triagem na detecção de lesões subjacentes ou seu subsequente desenvolvimento para mulheres com lesões citológicas menores ou equívocas. Além disso, permitem o seguimento de mulheres tratadas para lesões de alto grau para prever um sucesso ou falha no tratamento (Stevens, Garland et al. 2007).

Devido à sua alta prevalência na população e da sua alta relação com o desenvolvimento do CC, vacinas profiláticas contra certos genótipos de HPV foram e estão sendo desenvolvidas. A base da composição destas vacinas é o VLP (*virus-like particles*), que são partículas que mimetizam as proteínas do capsídeo viral L1. Elas não possuem o vírus atenuado ou material genético do HPV. Até o momento, há duas versões destas vacinas disponíveis: uma delas é chamada de quadrivalente (Gardasil®, Merck), pois protege contra quatro tipos de HPV mais comuns na população (16, 18, 6 e 11); a outra é conhecida como bivalente (Cervarix®, GlaxoSmithkline), pois imuniza contra dois tipos de HPV-HR mais comuns, 16 e 18. Ambas estão licenciadas para uso em mulheres e homens com idades entre 9 e 26 anos, sendo que o alvo maior são mulheres com idade em torno de 12 anos, antes do início da atividade sexual. Atualmente, através de diversos estudos, sabe-se que ambas as vacinas tem eficácia em torno de 100% na prevenção de lesões intraepiteliais cervicais especialmente em mulheres que nunca tiveram contato com algum tipo de HPV, e são muito bem toleradas. Pode-se inclusive obter proteção cruzada contra outros tipos de HPV não contemplados na vacina, devido às suas similaridades genéticas. A Organização Mundial da Saúde recomenda que a vacinação contra o HPV seja parte dos programas nacionais de vacinação (Wang 2007; Keam and Harper 2008; Ojaimi, BATTERY et al. 2009; Consolaro and Maria-Engler 2012).

### **3. Métodos diagnósticos**

#### **3.1 Metodologias citopatológicas**

##### **3.1.1 Citologia cérvico-vaginal**

A citologia cérvico-vaginal, desenvolvida por George Nicholas Papanicolaou, é uma técnica de triagem para detectar evidências precoces de câncer de colo uterino invasor. O teste consiste na coleta de células escamosas e glandulares (colunares) da abertura da cérvix uterina e examinadas sob coloração específica ao microscópio para determinar a presença de anormalidades celulares na cérvix (Breuer and Murph 2011). O esfregaço ideal contém representação citológica do epitélio da ectocérvix (epitélio escamoso), epitélio da endocérvix (epitélio glandular) e inclui a zona de transformação (Consolaro and Maria-Engler 2012).

A classificação de Bethesda, proposta em 1988 e revisada pela última vez em 2008, subdivide as células escamosas anormais em quatro grupos: Atípicas (engloba (Células escamosas atípicas de significado indeterminado – ASC-US e Células escamosas atípicas, não exclui lesão de alto grau – ASC-H), Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL); Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e Carcinoma Escamoso Invasor (Consolaro and Maria-Engler 2012). O exame de citologia cervical é o método de triagem mais efetivo, porém ainda possui uma especificidade limitada para lesões clinicamente significativas em casos com anormalidades de baixo grau e pode apresentar com frequência resultados falso-negativos, levando à demora no diagnóstico e tratamento de lesões pré-cancerosas e CC, ou mesmo casos de seguimento desnecessário da paciente. (Dehn, Torkko et al. 2007; Breuer and Murph 2011).

A triagem cervical por citologia, com adequado tratamento tem resultado numa diminuição da incidência e mortalidade de câncer cervical nos últimos 50 anos (Cerigo, Macdonald et al. 2011; Gok, Rozendaal et al. 2011; Schiffman, Wentzensen

et al. 2011). Entretanto, esse tipo de câncer ainda permanece como a segunda malignidade mais comum em mulheres nos países em desenvolvimento. Aproximadamente 50% das pacientes com CC nunca participou de programas de triagem e 30% teve pelo menos um resultado falso negativo devido a erros de coleta de amostra ou interpretação citológica, antes do desenvolvimento do câncer invasivo. Por essa razão, a ocorrência de alterações celulares num teste único de Papanicolaou apresenta sensibilidade somente de 50% para detecção da presença da doença (Siddiqui, Cohen et al. 2008).

### **3.1.2 Colposcopia**

Consiste em um exame detalhado da cérvix uterina, realizada por um médico ou colposcopista qualificado, utilizando um equipamento conhecido como colposcópio, que permite a visualização da cérvix com um aumento de 10 a 40 vezes (Pias 2009; Flanagan, Wilson et al. 2011). É utilizado no diagnóstico e tratamento de células cervicais anormais (Swancutt, Greenfield et al. 2008). O exame é realizado em três etapas: primeiramente o colo é visualizado sem a aplicação de qualquer solução e após é aplicado ácido acético a 3%, seguido de solução de Schiller. Dessa maneira podem ser observadas lesões e alterações mais evidentes e selecionar o local mais adequado para a realização da biópsia, caso necessário (Pias 2009).

### **3.1.3 Histopatologia cervical**

As lesões pré-cancerosas apresentam arquitetura celular ou epitelial anormal nas áreas localizadas na junção entre os epitélios escamoso e colunar do colo do útero, e são caracterizadas por uma gama de eventos que progridem desde uma atipia celular até vários graus de displasia ou neoplasia cervical intraepitelial (NIC), antes da progressão ao câncer invasivo (Boicea, Patrascu et al. 2012). O termo

displasia refere-se a uma atipia celular epitelial, intermediária entre o epitélio normal e NIC. A displasia foi primeiramente dividida em três grupos: discreta, moderada e severa, dependendo do grau de envolvimento do epitélio pelas células atípicas (Consolaro 2012). O termo NIC define a extensão total da lesão confinada ao epitélio. A NIC era dividida nos graus I, II e III: NIC I correspondia à displasia discreta, NIC II correspondia à displasia moderada e NIC III correspondia tanto à displasia severa quanto ao carcinoma “in situ”. Em 1990, uma terminologia histopatológica baseada em dois estadiamentos de doença foi proposta: NIC de baixo grau, compreendendo as anormalidades consistentes com lesões NIC I (tipicamente com a presença de coilócitos); e NIC de alto grau compreendendo NIC II e NIC III. As lesões de alto grau foram consideradas as verdadeiras precursoras do câncer invasivo (Boicea, Patrascu et al. 2012).

Mais de três milhões de casos de lesão intra-epitelial de baixo grau (LSIL), células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), células glandulares atípicas e células atípicas suspeitas não podendo excluir lesão de alto grau (ASC-H), são diagnosticadas nos EUA a cada ano. Esses casos requerem uma avaliação maior para identificar quais pacientes têm chance clinicamente significativa de obter um resultado de lesão de alto grau (HSIL) em biópsia cervical. Embora a biópsia seja historicamente considerada o método padrão-ouro no diagnóstico do CC, estudos recentes tem indicado que neste exame pode-se não detectar de 33 a 50% das lesões de alto grau devido a problemas na coleta ou falha diagnóstica (Dehn, Torkko et al. 2007).

## **3.2 Metodologias moleculares**

### **3.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase**

Uma forte associação entre o HPV e o CC estimulou o desenvolvimento de diversos testes diagnósticos, particularmente testes baseados em biologia molecular. O PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é um método *in vitro* que permite a



síntese enzimática de sequências específicas de DNA, usando dois iniciadores (*primers*) de oligonucleotídeos que hibridizam as fitas opostas e flanqueiam a região de interesse no DNA a ser analisado. Uma série repetida de ciclos envolvendo desnaturação do DNA, anelamento (hibridização) com os primers e a extensão pela DNA polimerase, resulta no acúmulo exponencial de um fragmento específico cujas extremidades são definidas pelas terminações 5' dos primers (Erich 1989). Esta técnica permite a detecção e análise de sequências gênicas específicas em uma pequena amostra do paciente.

A partir da obtenção de um produto amplificado, podem ser utilizadas diferentes técnicas para a diferenciação dos fragmentos específicos. Para o PCR convencional, a análise dos fragmentos normalmente é realizada através da visualização dos fragmentos amplificados em eletroforese em gel de agarose.

Para as análises de HPV de baixo e alto risco de maneira simultânea, são utilizados primers da região de consenso para estes grupos, o que permite sua identificação, porém não a diferenciação entre os diferentes tipos presentes na amostra. O resultado é expresso como ausência ou presença de HPV na amostra analisada.

#### **4. Biomarcadores**

Biomarcadores são moléculas utilizadas como indicadores de processos biológicos ou de resposta a uma intervenção terapêutica. Por esse motivo, têm sido amplamente estudados, principalmente no prognóstico e valor preditivo dos processos neoplásicos (Buhmeida and Ali 2011).

O câncer de mama, por exemplo, serve como um modelo para os outros tipos de cânceres, pois há uma variedade de biomarcadores incorporados aos testes preditivos e tratamentos terapêuticos para orientar as decisões médicas. Muitos cânceres não têm rastreio precoce, detecção ou valores prognósticos disponíveis, e o câncer de mama por esse ponto está liderando o caminho da inovação (Breuer and Murph 2011).

O método de rastreio para a neoplasia cervical é o exame citológico de Papanicolaou, uma técnica de triagem para detectar precocemente evidências de alterações citológicas. Devido às suas limitações, o interesse em desenvolver melhores biomarcadores para a sua detecção precoce tem aumentado substancialmente (Balasubramanian, Hughes et al. 2009). Muitos estudos têm focado especialmente a atenção ao potencial envolvimento do sistema purinérgico no desenvolvimento de tumores. Dentro deste sistema, nucleotídeos e enzimas, as ectonucleotidases, constituem moléculas importantes, conhecidas por regular as funções patofisiológicas do espaço extracelular. (Stella, Bavaresco et al. 2010). Entre estas, a enzima ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT) vem sendo amplamente estudada como um biomarcador em diversas neoplasias (Jin, Fan et al. 2010; Sowa, Taylor-Blake et al. 2010; Cappellari, Vasques et al. 2012; Quezada 2012; Stagg, Beavis et al. 2012). Até o momento, essa enzima já foi relacionada com diversos tipos de tumores, como câncer de mama, de cólon, de bexiga e gliomas, porém, há poucos estudos relacionando essa enzima com o CC (Stella, Bavaresco et al. 2010; Breuer and Murph 2011; Cappellari, Vasques et al. 2012; Wu, He et al. 2012).

## **5. Sistema Purinérgico**

As purinas são os mensageiros químicos mais primitivos do organismo humano (Burnstock and Verkhratsky 2009) e a sinalização purinérgica tem sido alvo de estudo em diversas áreas biomédicas (Di Virgilio, Ceruti et al. 2009). Há evidências de que possa ter efeitos tróficos no desenvolvimento embrionário, proliferação, diferenciação e morte celular (Greig, Linge et al. 2008). Fazem parte deste sistema de sinalização purinérgica, os nucleotídeos da adenina como ATP, ADP, AMP e seu derivado nucleosídeo adenosina, que são constituintes dos ácidos nucleicos (Maldonado, Pimentel et al. 2012; Gorini, Gatta et al. 2013). Esses nucleotídeos apresentam múltiplas funções no meio extracelular, representam a fonte de energia e comunicação intracelular e servem como substrato em vias de transdução (Gorini, Gatta et al. 2013).

Tanto o ATP, quanto o ADP e adenosina são potentes sinalizadores conhecidos pelo papel chave no controle da agregação plaquetária, tônus vascular e resposta inflamatória. As purinas são também liberadas a partir de células normais para o ambiente extracelular, ativando diversos mecanismos (Yegutkin, Marttila-Ichihara et al. 2011). A adenosina vem sendo descrita também por seu importante papel no crescimento tumoral e metástases. É relatada por estar presente em altas concentrações em tumores sólidos, com acúmulo intracelular e extracelular, sob condições de hipóxia e estímulo ao crescimento tumoral, angiogênese além de exercer efeitos imunossupressores (Cho, Polster et al. 2006).

Sua relação com o sistema imunológico está bem estabelecida. A adenosina age inibindo as respostas das células T, que incluem proliferação de antígenos, secreção de interleucina 2 e citocinas pró - inflamatórias como interferon- $\gamma$  e fator de necrose tumoral, superexpressão de CD25, indução de moléculas de efeitos citolíticos como perforinas e Fas ligante, adesão de células NK nas células tumorais e exocitose de grânulos citotóxicos por linfócitos T citotóxicos. Além disso, pode suprimir a atividade das células NK. Assim, devido às propriedades imunossupressivas da adenosina e a suposição de que esteja presente em altas concentrações em tumores sólidos, suspeita-se de que a adenosina pode constituir um importante papel barreira imunológica ao tumor, principal motivo de falha na efetividade da resposta imune antitumoral (Zhang 2010).

### **5.1 Receptores purinérgicos**

Uma vez no espaço extracelular, os nucleotídeos e nucleosídeos estão envolvidos em diversos processos biológicos e patológicos e seus efeitos são regulados por uma série de receptores específicos, amplamente distribuídos numa variedade diferente de microorganismos como mamíferos, plantas e bactérias (Gorini, Gatta et al. 2013). Os receptores purinérgicos são classificados em 2 grupos: receptores P1, que são seletivos para adenosina e receptores P2, seletivos para ATP. (Greig, Linge et al. 2008) Os receptores P2 são subdivididos em duas famílias: P2X e P2Y, baseados na sua estrutura molecular, mecanismos de transdução e propriedades farmacológicas (Greig, Linge et al. 2008). Uma grande variedade de

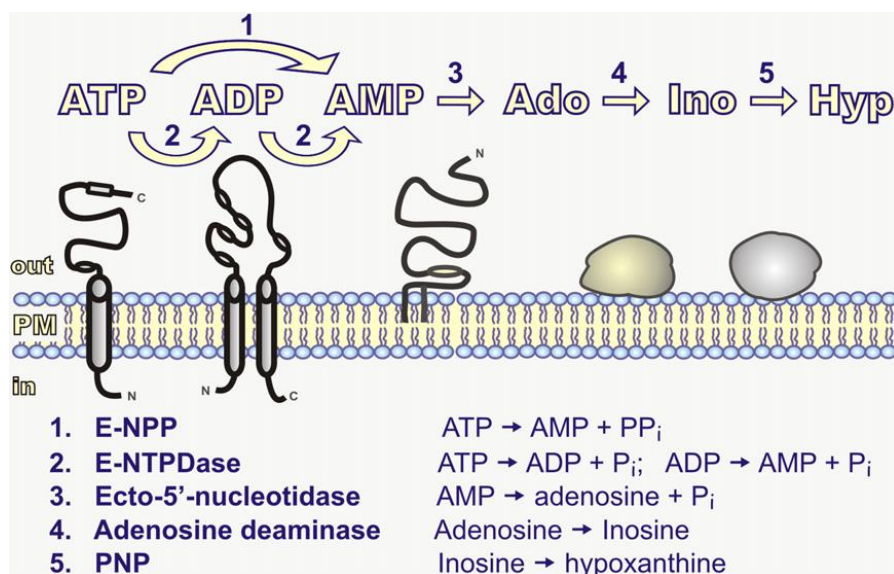
funções fisiológicas é regulada pelos receptores P2, incluindo a regulação do volume celular, irrigação sanguínea dos tecidos e inflamação (Gorini, Gatta et al. 2013).

## 5.2 Enzimas do sistema purinérgico

Diferentes famílias de enzimas controlam os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos regulando a sua disponibilidade para os receptores purinérgicos. São denominadas de ectonucleotidases e incluem: as ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases), ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfo-diesterases (E-NPPs), ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT) e fosfatases alcalinas (APs) (Aliagas 2012).

O ATP, em processos inflamatórios, é liberado por células durante a morte ou estresse celular, atuando como um sinalizador endógeno para convocar uma resposta a este estímulo. Os níveis do ATP extracelular são regulados pelas ectonucleotidases, que degradam sequencialmente o ATP a ADP a AMP e este em adenosina (Figura 4). Esta adenosina é gerada pela atividade de hidrólise da E-5'-NT. A atividade desta enzima proporciona um aumento da disponibilidade extracelular de adenosina pela hidrólise do AMP (Beavis, Stagg et al. 2012).

Figura 4: Representação esquemática das enzimas constituintes do sistema purinérgico acopladas à membrana plasmática e seus substratos.



Fonte: (Yegutkin 2008)

### 5.3 Ecto-5'-Nucleotidase (E-5'-NT, CD73)

A E-5'-NT é uma enzima ancorada à membrana que tem por função catalisar a conversão de adenosina monofosfato (AMP) em adenosina (Kruger, Thompson et al. 1991; Thompson, Eltzschig et al. 2004; Jin, Fan et al. 2010; Supernat, Markiewicz et al. 2012; Zhang 2012). É codificada no cromossomo 6 e, originalmente, definida como antígeno de diferenciação de linfócitos. É expressa em muitas células incluindo subtipos de linfócitos, células endoteliais e células epiteliais. A função primária atribuída a E-5'-NT é o catabolismo de nucleotídeos extracelulares, embora também possa mediar a ligação dos linfócitos em algumas circunstâncias (Thompson, Eltzschig et al. 2004). Acredita-se que a ação da E-5'-NT é em grande parte consequência da regulação de nucleotídeos extracelulares (Kruger, Thompson et al. 1991; Jin, Fan et al. 2010)

O papel da E-5'-NT e do seu produto adenosina na invasão pelas células tumorais, angiogênese e supressão da resposta imune tem despertado interesse de muitos pesquisadores. Ela age como um fator proliferativo, e está envolvida no controle do crescimento celular, proliferação celular, resistência a drogas e tem sido encontrada em altas concentrações em células cancerosas (Supernat, Markiewicz et al. 2012). Sua superexpressão está relacionada com um aumento do fenótipo maligno das células de câncer de mama e melanoma de alto grau (Cappellari, Vasques et al. 2012) (Wu, He et al. 2012)

O aumento da expressão da E-5'-NT tem sido observado em diversos tipos de câncer, e na neoplasia de mama, está relacionada a um pior prognóstico. Notavelmente, o gene da E-5'-NT se encontra superexpresso no receptor de estrógeno (ER) do câncer de mama, possivelmente porque o estrógeno age subregulando a expressão de E-5'-NT. A atividade da E-5'-NT requer uma produção aumentada de AMP, que está relacionada com o aumento da atividade de enzimas que hidrolisam sequencialmente ATP a AMP, como a NTPDase1/CD39, já descrita em diversos tipos de câncer, incluindo melanoma, ovário, cabeça e pescoço (Beavis, Stagg et al. 2012). Em estudo sobre a relevância desta enzima em um modelo de câncer ovariano imunocompetente, mostrou em diversos experimentos "in vivo" e "in

vitro”, que as células cancerosas sem a presença da E-5'-NT, aumentaram a ativação e expansão e diminuíram a apoptose de células T tumor-específicas. Inesperadamente, quando transferiu antígenos de células T específicos para ratos com ausência de E-5'-NT, todos eles tiveram os tumores ovarianos curados, enquanto os tumores de ratos com a presença desta mesma enzima, não puderam ser curados. Por isso, sugere-se a inibição da E-5'-NT como terapia adjuvante na imunoterapia anticâncer (Zhang 2010).

O envolvimento da E-5'-NT nos mecanismos de resistência a drogas e promoção da carcinogênese têm sido proposto e estudos recentes demonstram um possível envolvimento da E-5'-NT como um indicador de invasividade e agressividade em gliomas malignos (Stella, Bavaresco et al. 2010; Zhang 2010; Cappellari, Vasques et al. 2012). Além disso, a E-5'-NT também tem sido amplamente associada a um fenótipo pró-metastático em melanoma e câncer de mama, apresenta ainda valor prognóstico em pacientes com câncer de cólon e foi sugerida como um diagnóstico de apoio em carcinoma papilar de tireóide. (Zhang 2010).

Portanto, considerando vários estudos da literatura indicando esta proteína como um marcador prognóstico e/ou possível alvo terapêutico em processos tumorais, e que existem poucos estudos relacionando sua participação na gênese e prognóstico do CC e suas lesões precursoras, torna-se interessante como alvo de estudos mais aprofundados nesta patologia.

## JUSTIFICATIVA

O CC é a segunda neoplasia mais frequente em mulheres no mundo todo, sendo uma das principais causas de morte entre as mesmas. A detecção do câncer, em seus estágios iniciais pode poupar a vida da paciente, visto que a sobrevivência a este tipo de câncer depende do estágio em que a doença se encontra no diagnóstico. É aceito que a maioria das lesões intraepiteliais cervicais é atribuída à infecção pelo *Papiloma vírus humano* (HPV) de alto risco, causando lesões em diferentes graus. Estudos indicam que a enzima E-5'-NT/CD73 está envolvida no processo de carcinogênese em vários tipos de neoplasias, justificando-se assim o interesse em determinar a expressão dessa enzima em carcinoma do colo uterino e sua correlação com a presença do HPV. A hipótese inicial de trabalho é de que pacientes infectados por HPV, que potencialmente podem apresentar maior tendência ao desenvolvimento de lesões pré-malignas e câncer, possam apresentar uma elevação na expressão da E-5'-NT/CD73, podendo esta enzima servir como marcador da carcinogênese.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo primário**

Esse estudo visa determinar a expressão da enzima E-5'-NT bem como identificar a presença ou não do HPV, em amostras de raspado citológico em pacientes sem alterações no colo do útero e pacientes com lesões intraepiteliais escamosas de baixo e alto grau.

### **Objetivo secundário**

Avaliar a relação entre a expressão da enzima E-5'-NT e a presença de HPV nos três grupos avaliados (pacientes sem alterações no colo do útero, pacientes com lesões intraepiteliais escamosas de baixo e alto grau).



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA

(2012). Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde - Ministério da Saúde.

(2012). Instituto Nacional do Câncer - INCA: [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br).

Aliagas, E. (2012). "Ecto-nucleotidases distribution in human cyclic and postmenopausal endometrium." Springer Science.

Ancuta, E., C. Ancuta, et al. (2009). "Tumor biomarkers in cervical cancer: focus on Ki-67 proliferation factor and E-cadherin expression." Rom J Morphol Embryol **50**(3): 413-418.

Balasubramanian, A., J. Hughes, et al. (2009). "Evaluation of an ELISA for p16INK4a as a screening test for cervical cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **18**(11): 3008-3017.

Beavis, P. A., J. Stagg, et al. (2012). "CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses." Trends Immunol **33**(5): 231-237.

Boicea, A., A. Patrascu, et al. (2012). "Correlations between colposcopy and histologic results from colposcopically directed biopsy in cervical precancerous lesions." Rom J Morphol Embryol **53**(3 Suppl): 735-741.

Boulet, G. A., I. H. Benoy, et al. (2009). "Human papillomavirus 16 load and E2/E6 ratio in HPV16-positive women: biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia  $\geq 2$  in a liquid-based cytology setting?" Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **18**(11): 2992-2999.

Breuer, E. K. and M. M. Murph (2011). "The Role of Proteomics in the Diagnosis and Treatment of Women's Cancers: Current Trends in Technology and Future Opportunities." Int J Proteomics **2011**.

Buhmeida, A. and P. Z. Ali (2011). "Biomarkers in cancer: is 'omics' the way to go." Libyan J Med **6**.

Burd, E. M. (2003). "Human papillomavirus and cervical cancer." Clin Microbiol Rev **16**(1): 1-17.

Burnstock, G. and A. Verkhratsky (2009). "Evolutionary origins of the purinergic signalling system." Acta Physiol (Oxf) **195**(4): 415-447.

Cappellari, A. R., G. J. Vasques, et al. (2012). "Involvement of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in U138MG glioma cell adhesion." Mol Cell Biochem **359**(1-2): 315-322.

Cerigo, H., M. E. Macdonald, et al. (2011). "Inuit women's attitudes and experiences towards cervical cancer and prevention strategies in Nunavik, Quebec." Int J Circumpolar Health: 0.

Cho, S. Y., J. Polster, et al. (2006). "In vitro evaluation of adenosine 5'-monophosphate as an imaging agent of tumor metabolism." J Nucl Med **47**(5): 837-845.

Consolaro, M. E. and S. S. Maria-Engler (2012). Citologia Clínica Cérvico-Vaginal Texto e Atlas. São Paulo, Roca.

Consolaro, M. E. L. (2012). Citologia Clínica Cérvico-Vaginal Texto e Atlas. São Paulo, Grupo Editorial Nacional.

Dalstein, V., S. Merlin, et al. (2009). "Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus." J Virol Methods **156**(1-2): 77-83.

Dehn, D., K. C. Torkko, et al. (2007). "Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma." Cancer **111**(1): 1-14.

Di Virgilio, F., S. Ceruti, et al. (2009). "Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system." Trends Neurosci **32**(2): 79-87.

Erlich, H. A. (1989). "Polymerase chain reaction." J Clin Immunol **9**(6): 437-447.

Flanagan, S. M., S. Wilson, et al. (2011). "Adverse outcomes after colposcopy." BMC Womens Health **11**: 2.

Gok, M., L. Rozendaal, et al. (2011). "Cytology history preceding cervical cancer diagnosis: a regional analysis of 286 cases." Br J Cancer **104**(4): 685-692.

Gorini, S., L. Gatta, et al. (2013). "Regulation of innate immunity by extracellular nucleotides." Am J Blood Res **3**(1): 14-28.

Greig, A. V., C. Linge, et al. (2008). "Purinergic receptors are part of a signalling system for proliferation and differentiation in distinct cell lineages in human anagen hair follicles." Purinergic Signal **4**(4): 331-338.

Hoory, T., A. Monie, et al. (2008). "Molecular epidemiology of human papillomavirus." J Formos Med Assoc **107**(3): 198-217.

Insinga, R. P., E. J. Dasbach, et al. (2007). "Progression and regression of incident cervical HPV 6, 11, 16 and 18 infections in young women." Infect Agent Cancer **2**: 15.

Jin, D., J. Fan, et al. (2010). "CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression." Cancer Res **70**(6): 2245-2255.

Keam, S. J. and D. M. Harper (2008). "Human papillomavirus types 16 and 18 vaccine (recombinant, AS04 adjuvanted, adsorbed) [Cervarix]." Drugs **68**(3): 359-372.

Keam, S. J. and D. M. Harper (2008). "Human papillomavirus types 16 and 18 vaccine (recombinant, AS04 adjuvanted, adsorbed) [Cervarix]: profile report." BioDrugs **22**(3): 205-208.

Kruger, K. H., L. F. Thompson, et al. (1991). "Expression of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in normal mammary gland and in breast carcinoma." Br J Cancer **63**(1): 114-118.

Lee, S. H., V. S. Vigliotti, et al. (2007). "Routine human papillomavirus genotyping by DNA sequencing in community hospital laboratories." Infect Agent Cancer **2**: 11.

Loomis, D. M., P. A. Pastore, et al. (2009). "Cervical cytology in vulnerable pregnant women." J Am Acad Nurse Pract **21**(5): 287-294.

Maldonado, P. A., V. C. Pimentel, et al. (2012). "Role of the purinergic system in patients with cervical intraepithelial neoplasia and uterine cancer." Biomed Pharmacother **66**(1): 6-11.

Malinowski, D. P. (2005). "Molecular diagnostic assays for cervical neoplasia: emerging markers for the detection of high-grade cervical disease." Biotechniques Suppl: 17-23.

Malinowski, D. P. (2007). "Multiple biomarkers in molecular oncology. I. Molecular diagnostics applications in cervical cancer detection." Expert Rev Mol Diagn **7**(2): 117-131.

Mayrand, M. H., E. Duarte-Franco, et al. (2007). "Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer." N Engl J Med **357**(16): 1579-1588.

Munoz, N., F. X. Bosch, et al. (2003). "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer." N Engl J Med **348**(6): 518-527.

Munoz, N., X. Castellsague, et al. (2006). "Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer." Vaccine **24 Suppl 3**: S3/1-10.

Nath, A. K. and D. M. Thappa (2009). "Vaccines for human papillomavirus infection: a critical analysis." Indian J Dermatol Venereol Leprol **75**(3): 245-253; quiz 254.

Ojaimi, S., J. P. Buttery, et al. (2009). "Quadrivalent Human Papillomavirus recombinant vaccine associated lipoatrophy." Vaccine **27**(36): 4876-4878.

Pias, A. d. A. V., Vera Regina Andrade. (2009). "Avaliação dos exames citológicos de papanicolaou com células epiteliais atípicas e respectivos exames

colposcópicos com relação aos exames histopatológicos." Rev. bras. anal. clin **41**(2): 155-160.

Quezada, C. (2012). "5'-ectonucleotidase mediates multiple-drug resistance in glioblastoma multiforme cells." Journal of Cellular Physiology.

Rapose, A. (2009). "Human papillomavirus and genital cancer." Indian J Dermatol Venereol Leprol **75**(3): 236-243; quiz 243-234.

Rosa, M. (2007). Papilomavirus Humano e lesões do colo uterino. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.

Schiffman, M., N. Wentzensen, et al. (2011). "Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer." J Natl Cancer Inst **103**(5): 368-383.

Siddiqui, M. T., C. Cohen, et al. (2008). "Detecting high-grade cervical disease on ASC-H cytology: role of BD ProEx C and Digene Hybrid Capture II HPV DNA testing." Am J Clin Pathol **130**(5): 765-770.

Sowa, N. A., B. Taylor-Blake, et al. (2010). "Ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits nociception by hydrolyzing AMP to adenosine in nociceptive circuits." J Neurosci **30**(6): 2235-2244.

Stagg, J., P. A. Beavis, et al. (2012). "CD73-deficient mice are resistant to carcinogenesis." Cancer Res **72**(9): 2190-2196.

Stagg, J., U. Divisekera, et al. (2011). "CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis." Cancer Res **71**(8): 2892-2900.

Stella, J., L. Bavaresco, et al. (2010). "Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines." Urol Oncol **28**(3): 260-267.

Stevens, M. P., S. M. Garland, et al. (2007). "Comparison of the Digene Hybrid Capture 2 assay and Roche AMPLICOR and LINEAR ARRAY human papillomavirus (HPV) tests in detecting high-risk HPV genotypes in specimens from women with previous abnormal Pap smear results." J Clin Microbiol **45**(7): 2130-2137.

Supernat, A., A. Markiewicz, et al. (2012). "CD73 expression as a potential marker of good prognosis in breast carcinoma." Appl Immunohistochem Mol Morphol **20**(2): 103-107.

Swancutt, D. R., S. M. Greenfield, et al. (2008). "Women's colposcopy experience and preferences: a mixed methods study." BMC Womens Health **8**: 2.

Thompson, L. F., H. K. Eltzschig, et al. (2004). "Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia." J Exp Med **200**(11): 1395-1405.

Wang, K. L. (2007). "Human papillomavirus and vaccination in cervical cancer." Taiwan J Obstet Gynecol **46**(4): 352-362.

Wu, X. R., X. S. He, et al. (2012). "High expression of CD73 as a poor prognostic biomarker in human colorectal cancer." J Surg Oncol **106**(2): 130-137.

Yegutkin, G. G. (2008). "Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade." Biochim Biophys Acta **1783**(5): 673-694.

Yegutkin, G. G., F. Marttila-Ichihara, et al. (2011). "Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression." Eur J Immunol **41**(5): 1231-1241.

Zhang, B. (2010). "CD73: a novel target for cancer immunotherapy." Cancer Res **70**(16): 6407-6411.

Zhang, B. (2012). "CD73 promotes tumor growth and metastasis." Oncoimmunology **1**(1): 67-70.

**ARTIGO EM INGLÊS**

**Expression of ecto-5'-nucleotidase and its relationship with Human Papilloma  
Virus in patients with and without Low and High Grade Squamous  
Intraepithelial Lesions**

**Expression of ecto-5'-nucleotidase and its relationship with Human Papilloma Virus in patients with and without Low and High Grade Squamous Intraepithelial Lesions**

**Tarissa Torres Moreira<sup>1</sup>, Andréia Buffon<sup>2</sup>, Diogo André Pilger<sup>2</sup>, Luciane Calil<sup>2</sup>, Paulo Naud<sup>3</sup>, Ricardo dos Reis<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Postgraduate Program of Clinical Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup>Analyses Department, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup>Oncological Gynecology, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

✉Corresponding Author:

Tarissa Torres Moreira

Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia, UFRGS

Av. Ipiranga 2752, bairro Santana

CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone: + 55 51 33085276

E-mail: [tarimoreira@gmail.com](mailto:tarimoreira@gmail.com)



## **ABSTRACT**

**Aim of the study:** Evaluate the expression of the enzyme ecto-5'-nucleotidase (5'-NT-E) and its relationship with the presence of HPV in patients who were negative for squamous intraepithelial lesion or malignancy and patients with low and high grade squamous intraepithelial lesions.

**Methods:** A total of 57 patients were selected from July 2012 to January 2013 at Gynecology Oncology and Cervical Pathology, located at Hospital de Clinicas de Porto Alegre. They were subdivided into 3 groups: negative for squamous intraepithelial lesion (NILM), low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) and high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL). HPV test was performed by standard PCR methodology and enzyme expression was determined by flow cytometry. Mean age, parity, age at first sexual intercourse and frequency of smoking were also assessed in the sample.

**Results:** The prevalence of HPV was 8.5%. In the control group (NLPM) none of the patients had a positive test for HPV. In LSIL group, 18.8% were detected with HPV and in HSIL group, 11.1%. In the E-5'-NT analysis the median of enzyme positivity was 1.28% (interquartile range: 0.31 to 3.61). When comparing the distribution of the enzyme between the groups with and without lesions, we found no statistically significant difference ( $P = 0.182$ ) neither HPV association ( $P = 0.96$ ).

**Conclusion:** In the present study, we found no significant differences in the expression of E-5'-NT enzyme among patients without squamous intraepithelial cervical lesions, LSIL and HSIL pap smears, and no association between the expression of the enzyme and the presence of HPV DNA. Further studies with a larger sample population, including cases of invasive cervical carcinoma, are needed to elucidate these relationships.

**Keywords:** Cervical cancer, ecto-5'-nucleotidase, HPV infection, squamous intraepithelial lesions.

## RESUMO

**Objetivo do estudo:** Avaliar a expressão da enzima ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT) e a sua relação com a presença de HPV em pacientes negativos para lesão intra-epitelial escamosa ou malignidade, pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau e lesão intra-epitelial escamosa de alto grau.

**Métodos:** Um total de 57 pacientes foi selecionado a partir de julho 2012 a janeiro de 2013 atendidas no ambulatório de Ginecologia Oncológica e Patologia Cervical do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Elas foram divididas em três grupos: negativo para lesão intra-epitelial escamosa (NILM), lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL) e lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HSIL). A pesquisa de HPV foi realizada por PCR convencional e a expressão da enzima foi determinada por citometria de fluxo. Também foi avaliado na amostra a média de idade, paridade, sexarca e frequência de tabagismo.

**Resultados:** A prevalência de HPV analisado por PCR na amostra estudada foi de 8,7%. No grupo controle (NILM), nenhuma das pacientes teve teste para HPV positivo. No grupo LSIL, 18.8% tiveram HPV detectado na amostra e, no grupo HSIL, 11.1%. Na análise da enzima E-5'-NT realizada por citometria de fluxo, a mediana de positividade foi 1,28% (intervalo interquartil: 0,31 a 3,61). Quando comparamos as distribuições da enzima entre os grupos com e sem lesão, não encontramos diferença estatisticamente significativa ( $P=0,182$ ), nem associação com a presença de HPV ( $P=0,96$ )

**Conclusão:** Considerando que, no presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas de expressão da E-5'-NT entre pacientes sem lesão intra-epitelial escamosa cervical quando comparadas com os grupos LSIL e HSIL, e nenhuma associação entre a expressão da enzima e a presença de DNA de HPV, maiores estudos, com uma maior população amostral, incluindo casos de carcinoma cervical invasor, são necessários para elucidar estas relações.

**Palavras-chave:** câncer cervical, ecto-5'-nucleotidase, HPV, lesão intra-epitelial escamosa.

## INTRODUCTION

The invasive carcinoma of the cervix is the second most common cancer in women worldwide and is a leading cause of death among them (Munoz, et al Castellsague. 2006; Insinga, Dasbach et al. 2007; Kemal and Harper 2008; Dalstein, Merlin et al. 2009; Thappa and Nath 2009). The discovery in the early stages provides high cure rates, since the survival of this type of cancer depends on the stage at which the disease is found in diagnosis. It is accepted that most cervical intraepithelial lesions is attributed to the infection by high risk human papillomavirus (HPV), which causes injuries to varying degrees (Chen, Schiffman et al. 2011).

Recent studies have shown that increased expression of ecto-5'-nucleotidase (5'-NT-E) has been observed in several types of neoplasms. An increased expression of this enzyme has been linked to increased cell proliferation and pro-metastatic phenotype in some cancers (Beavis, Stagg et al. 2012; Cappellari, Vasques et al. 2012; Wu, He et al. 2012). In breast cancer, gene E-5'-NT is overexpressed in estrogen receptor (ER) and is associated with a worse prognosis, possibly because estrogen regulates partially the expression of E-5'-NT (Beavis , Stagg et al. 2012). A study about the relevance of this enzyme in an immunocompetent ovarian cancer model showed, in several experiments "in vivo" and "in vitro", that cancer cells without the presence of E-5'-NT increased activation and expansion and decreased apoptosis of tumor-specific T cells (Zhang 2012).

Today there is only one study, published recently, which correlates the expression of this enzyme with squamous intraepithelial lesions of the cervix. No studies have so far correlated the expression of the enzyme and the presence of HPV. This study is designed to determine the expression of E-5'-NT, identify the presence or absence of HPV and assess the relationship between the expression of this enzyme and HPV presence in samples from patients without pap smears changes in the cervix and patients with low and high grade squamous intraepithelial lesions.

## **MATERIALS AND METHODS**

### Criteria for selection of patients

A cross-sectional study randomly selected patients attending the outpatient clinic from the Department of Oncological Gynecology and Cervical Pathology, at Hospital de Clinicas de Porto Alegre from July 2012 to January 2013. The protocol was approved by the Ethics in Research Committee under the number 11026483. During a routine visit, along the collect of the sample for cytology and / or biopsy samples, samples of cervix squamous cells were collected. The patients negative for squamous intraepithelial lesion or malignancy on cytological examination were selected for the control group. For groups of patients with squamous intraepithelial lesions of low and high grade, patients who tested positive for lesions in cytological examinations and / or biopsy were selected. The histology result always prevailed when it was performed. The results of cytological and histological examinations were classified according to the Bethesda System 2001. The data collected from patients were age, parity, smoking and first sexual intercourse. Patients who have been treated for some gynecological malignancy, patients who have undergone pelvic radiotherapy for any reason, patients who have had no sexual intercourse and patients menstruating were excluded from the study.

The sample size was obtained by the software PEPI 4.0 and was based on the difference among the proportions of altered enzyme expression groups with low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) and negative for squamous intraepithelial lesion or malignancy (NILM) around 44% (66% staining of p16 in normal group compared to the group with 100% of HSIL, based on the study of Halloush). For a significance level of 5% and a power level of 80%, a minimum total of 78 patients were obtained.

### Sample Collection

The sample collection for cytology was performed using the Ayre spatula and endocervical brush and the material was placed on a glass slide and fixed with 95% ethanol. To collect the samples to be used in the analysis by flow cytometry and molecular research of HPV, a Digene HC2 Colection Device DNA collection kit was

used, which stored the endocervical brush in a vial containing 1 ml used as a transport medium to the laboratory.

#### Quantitation of E-5'-NT

The quantitation of E-5'-NT was performed by flow cytometry. Firstly, the cells were washed with cervical fetal bovine albumin in 0.05% saline so that they did not remain adhered to each other. After that they were incubated for 30 minutes with the monoclonal antibody Anti-Human anti-CD73 conjugated with a fluorophore with phycoerythrin (PE) (BD Biosciences). The incubation was performed at room temperature and protected from light. The analyses were performed on equipment Verse FACS ® (BD Biosciences). The percentage of positive fluorescence in the labeled cells in comparison with the analysis of the same cells not stained with the antibody was analyzed.

#### HPV molecular Research

Initially we performed DNA sample extraction using the commercial kit QIAamp DNA mini kit bood (QIAgen ®).

HPV analysis was performed using the Polymerase Chain Reaction (PCR). To simultaneously determine HPV high and low risk, consensus primers for the region of these groups were used, which allow the identification, but not the differentiation among different types present in the sample. The sequences of primers used were: MY09: CGTCCAAGAGGATACTGA and MY11: GCCCAGGGTCATAACAAT (Shen-Gunther and Yu 2011). The PCR conditions were: 95 ° C for 3 minutes followed by 35 cycles of 94 ° C for 1 minute, 50 ° C for 1 min and 72°C for 1 minute. At the end, there was an extension of 10 minutes at 72 ° C. It was used a quantity of 5uL DNA extracted to a final volume of 50uL. HPV positivity was performed by the presence of fragment size 450 bp that visualized in agarose gel electrophoresis.

We performed *b-actin* gene amplification as endogenous control to rule out false-negative results from samples with low amount of material or even extractions with low efficiency.

## Statistical Analysis

Data were analyzed in SPSS version 18.0 for statistical analysis. Categorical variables were described by absolute frequency and relative frequency percentage. When the distribution of quantitative variables was symmetrical, they were described by the mean and standard deviation. When this was asymmetric, it was used the median and interquartile range (25th percentile and 75th percentile). Categorical variables were associated with the Fisher exact test. Quantitative variables with skewed distribution were compared by Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test. Variables with symmetric distribution were compared by the Student t test for independent samples. It was considered a significance level of 5%.

## RESULTS

Considering it is a partial analysis of the results, 57 patients were evaluated so far. In the cytological examinations and/or biopsy, 23 patients (40.4%) tested negative for squamous intraepithelial lesion or malignancy (NILM), 16 patients (28.1%) had low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) and 18 patients (31.6%) had high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL). Mean patient age was 41.7 years with a standard deviation of 14.3 years. The median number of pregnancies in these patients was 2 (interquartile range 1-4). Regarding the number of sexual partners, 38 women (66.6%) had less than 3 partners and 19 (33.3%) had four or more sexual partners. In the analysis of smoking, 46 (80.7%) were non-smokers and 11 (19.3%) smokers. Of the 46 non-smokers, 5 (10.9%) were positive for HPV. None of the 11 smokers had a positive test for HPV. There was no statistically significant difference ( $P = 0.571$ ) (Table 1).

The HPV prevalence in the sample was 8.7% ( $n = 5$ ). In the control group (NILM), none of the patients had a positive test for HPV. In LSIL group, 18.8% ( $n = 3$ ) had HPV detected in the sample and, in HSIL group, 11.1% ( $n = 2$ ). Of 38 women with less than 4 partners, 10.5% ( $n = 4$ ) had a positive HPV test. Only 1 (5.3%) out of 19 patients with 4 or more partners had a positive test. There was no statistical difference.

In enzyme 5'-NT performed by flow cytometry, the median positivity was 1.28% (interquartile range: 0.31 to 3.61). In the control group, the median was 3.36%

(interquartile range: 0:35 to 7:34). In LSIL group the median was 0.65 (interquartile range: 0:27 to 2:32) and 1.75 (interquartile range: 0.24 to 2.77) in HSIL group (Table 2). When we compared the enzyme distribution between the groups with and without lesions, we found no statistically significant difference ( $P = 0.182$ ) (Figure 1).

Then we assessed the enzyme expression compared to HPV positive. The median expression of E-5'-NT in patients without HPV was 1.41 (interquartile range: 0.32 to 3.71). Of the patients with HPV positive, the median was 0.96 (interquartile range: 0.19 to 12.1). Also, there was no statistically significant difference between groups ( $P = 0.534$ ) (Figure 2)

## **DISCUSSION**

The enzyme E-5'-NT has been widely studied due to its importance in the metabolism of extracellular ATP, in which the final product adenosine has great relevance for their immunosuppressive properties (Cappellari, Rockenbach et al. 2012). Recent studies have reported that an increased expression of E-5'-NT is related to several types of cancer. Maldonado et al. evaluated potential interference of E-5'-NT activity and adenosine in cervical lesions and observed no relationship between them. In our study, we found that the E-5'-NT is decreased in HSIL group compared to the control group (NILM), although not statistically significant, which confirms the findings of the study by Maldonado et al.

Several studies have demonstrated the relationship between E-5'-NT with various types of cancer. A study that evaluated two patient groups with colorectal cancer ( $n = 358$ ) found evidence that a high expression of E-5'-NT is a strong and independent predictor of decreased survival (Wu, He et al. 2012). According to these results, the analysis of E-5'-NT expression by immunohistochemistry in tumor has been suggested as a diagnostic marker to identify additional patients with high risk of tumor progression. In glioblastoma cells, characterized by being extremely resistant to anticancer drugs by the presence of MRP1 protein, an enzyme blocking due to treatment with adenosine 5'-alpha beta-methylenediphosphate inhibited the expression of MRP1, which made vincristine-sensitive cells (Quezada 2012). Furthermore, evaluation of the role of E-5'-NT in the generation of extracellular

adenosine in cell lines of breast cancer indicated that overexpression of this enzyme may facilitate adhesion, migration and invasion of breast cancer cells through its enzymatic activity, which indicates a possible molecular mechanism of metastasis in this tumor type (Supernat, Markiewicz et al. 2012).

HPV plays a central role in the etiology of virtually all cases of cervical cancer with an estimated prevalence of 15.6% in the Americas (Hoory, Monie et al. 2008; Wentzensen and Schiffman 2010). Our data show that 8.5% of women had HPV detected in samples of cervical cells and we did not hold distinction between the types of high or low risk HPV. According to the literature, the prevalence of HPV infection in women varies depending on the evaluated population and mainly on the method used to detection of viruses. In a meta-analysis that included nine studies in India, the prevalence of HPV in women with normal cervical smear was 12% and 97.6% in women with CC (Rapose 2009). Another large cohort study conducted in a population-based in Colombia revealed a prevalence of HPV infection by 15% (Molano, Van den Brule et al. 2003).

Besides the expression of E-5'-NT in different degrees of cervical intraepithelial lesion, we also evaluated, in our study, the factor "presence of HPV" in relation to the enzyme expression, but we did not find statistically significant results in any of the assessments. However, in our sample population there were not patients with CC in force, and so we were unable to fully assess the relationship between E-5'-NT with oncogenic potential triggered during infection by the HPV virus in cervical epithelial cells. There are few studies investigating the relationship between HPV and E-enzyme 5'-NT and its involvement in carcinogenesis of CC so far. We believe this is the first study correlating the expression of the enzyme in the presence or absence of HPV virus.

Although there is no difference among groups, there is a decrease in enzyme expression in groups with lesion. Perhaps the fact that HPV life cycle is a non-lytic cycle, (in which virions generated in productive infection are released into the environment extracellular while the epithelial cells slough off), danger signals such as ATP, are not released in the infected tissue as described by Consolaro et al. contributing so that to haven't an enzyme increase in extracellular medium. Thus, the data lack of correlation between HPV and E-5'-NT could be explained.



These data should be interpreted with caution because the sample size is not yet complete, especially in patients with high-grade lesion. Considering that in the present study we found no significant differences in expression of E-5'-NT among patients without cervical lesion compared to the stages of LSIL, HSIL, and no association between the expression of the enzyme and the presence of HPV DNA, further studies with a larger sample population, including cases of invasive cervical carcinoma, are needed to elucidate these relationships.

## REFERENCES

(2012). Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde - Ministério da Saúde.

(2012). Instituto Nacional do Câncer - INCA: [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br).

Aliagas, E. (2012). "Ecto-nucleotidases distribution in human cyclic and postmenopausal endometrium." Springer Science.

Ancuta, E., C. Ancuta, et al. (2009). "Tumor biomarkers in cervical cancer: focus on Ki-67 proliferation factor and E-cadherin expression." Rom J Morphol Embryol **50**(3): 413-418.

Balasubramanian, A., J. Hughes, et al. (2009). "Evaluation of an ELISA for p16INK4a as a screening test for cervical cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **18**(11): 3008-3017.

Beavis, P. A., J. Stagg, et al. (2012). "CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses." Trends Immunol **33**(5): 231-237.

Boicea, A., A. Patrascu, et al. (2012). "Correlations between colposcopy and histologic results from colposcopically directed biopsy in cervical precancerous lesions." Rom J Morphol Embryol **53**(3 Suppl): 735-741.

Boulet, G. A., I. H. Benoy, et al. (2009). "Human papillomavirus 16 load and E2/E6 ratio in HPV16-positive women: biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia  $\geq 2$  in a liquid-based cytology setting?" Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **18**(11): 2992-2999.

Breuer, E. K. and M. M. Murph (2011). "The Role of Proteomics in the Diagnosis and Treatment of Women's Cancers: Current Trends in Technology and Future Opportunities." Int J Proteomics **2011**.

Buhmeida, A. and P. Z. Ali (2011). "Biomarkers in cancer: is 'omics' the way to go." Libyan J Med **6**.

Burd, E. M. (2003). "Human papillomavirus and cervical cancer." Clin Microbiol Rev **16**(1): 1-17.

Burnstock, G. and A. Verkhratsky (2009). "Evolutionary origins of the purinergic signalling system." Acta Physiol (Oxf) **195**(4): 415-447.

Cappellari, A. R., G. J. Vasques, et al. (2012). "Involvement of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in U138MG glioma cell adhesion." Mol Cell Biochem **359**(1-2): 315-322.

Cerigo, H., M. E. Macdonald, et al. (2011). "Inuit women's attitudes and experiences towards cervical cancer and prevention strategies in Nunavik, Quebec." Int J Circumpolar Health: 0.

Cho, S. Y., J. Polster, et al. (2006). "In vitro evaluation of adenosine 5'-monophosphate as an imaging agent of tumor metabolism." J Nucl Med **47**(5): 837-845.

Consolaro, M. E. and S. S. Maria-Engler (2012). Citologia Clínica Cérvico-Vaginal Texto e Atlas. São Paulo, Roca.

Consolaro, M. E. L. (2012). Citologia Clínica Cérvico-Vaginal Texto e Atlas. São Paulo, Grupo Editorial Nacional.

Dalstein, V., S. Merlin, et al. (2009). "Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus." J Virol Methods **156**(1-2): 77-83.

Dehn, D., K. C. Torkko, et al. (2007). "Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma." Cancer **111**(1): 1-14.

Di Virgilio, F., S. Ceruti, et al. (2009). "Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system." Trends Neurosci **32**(2): 79-87.

Erlich, H. A. (1989). "Polymerase chain reaction." J Clin Immunol **9**(6): 437-447.

Flanagan, S. M., S. Wilson, et al. (2011). "Adverse outcomes after colposcopy." BMC Womens Health **11**: 2.

Gok, M., L. Rozendaal, et al. (2011). "Cytology history preceding cervical cancer diagnosis: a regional analysis of 286 cases." Br J Cancer **104**(4): 685-692.

Gorini, S., L. Gatta, et al. (2013). "Regulation of innate immunity by extracellular nucleotides." Am J Blood Res **3**(1): 14-28.

Greig, A. V., C. Linge, et al. (2008). "Purinergic receptors are part of a signalling system for proliferation and differentiation in distinct cell lineages in human anagen hair follicles." Purinergic Signal **4**(4): 331-338.

Hoory, T., A. Monie, et al. (2008). "Molecular epidemiology of human papillomavirus." J Formos Med Assoc **107**(3): 198-217.

Insinga, R. P., E. J. Dasbach, et al. (2007). "Progression and regression of incident cervical HPV 6, 11, 16 and 18 infections in young women." Infect Agent Cancer **2**: 15.

Jin, D., J. Fan, et al. (2010). "CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression." Cancer Res **70**(6): 2245-2255.

Keam, S. J. and D. M. Harper (2008). "Human papillomavirus types 16 and 18 vaccine (recombinant, AS04 adjuvanted, adsorbed) [Cervarix]." Drugs **68**(3): 359-372.

Keam, S. J. and D. M. Harper (2008). "Human papillomavirus types 16 and 18 vaccine (recombinant, AS04 adjuvanted, adsorbed) [Cervarix]: profile report." BioDrugs **22**(3): 205-208.

Kruger, K. H., L. F. Thompson, et al. (1991). "Expression of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in normal mammary gland and in breast carcinoma." Br J Cancer **63**(1): 114-118.

Lee, S. H., V. S. Vigliotti, et al. (2007). "Routine human papillomavirus genotyping by DNA sequencing in community hospital laboratories." Infect Agent Cancer **2**: 11.

Loomis, D. M., P. A. Pastore, et al. (2009). "Cervical cytology in vulnerable pregnant women." J Am Acad Nurse Pract **21**(5): 287-294.

Maldonado, P. A., V. C. Pimentel, et al. (2012). "Role of the purinergic system in patients with cervical intraepithelial neoplasia and uterine cancer." Biomed Pharmacother **66**(1): 6-11.

Malinowski, D. P. (2005). "Molecular diagnostic assays for cervical neoplasia: emerging markers for the detection of high-grade cervical disease." Biotechniques Suppl: 17-23.

Malinowski, D. P. (2007). "Multiple biomarkers in molecular oncology. I. Molecular diagnostics applications in cervical cancer detection." Expert Rev Mol Diagn **7**(2): 117-131.

Mayrand, M. H., E. Duarte-Franco, et al. (2007). "Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer." N Engl J Med **357**(16): 1579-1588.

Munoz, N., F. X. Bosch, et al. (2003). "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer." N Engl J Med **348**(6): 518-527.

Munoz, N., X. Castellsague, et al. (2006). "Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer." Vaccine **24 Suppl 3**: S3/1-10.

Nath, A. K. and D. M. Thappa (2009). "Vaccines for human papillomavirus infection: a critical analysis." Indian J Dermatol Venereol Leprol **75**(3): 245-253; quiz 254.

Ojaimi, S., J. P. Buttery, et al. (2009). "Quadrivalent Human Papillomavirus recombinant vaccine associated lipoatrophy." Vaccine **27**(36): 4876-4878.

Pias, A. d. A. V., Vera Regina Andrade. (2009). "Avaliação dos exames citológicos de papanicolaou com células epiteliais atípicas e respectivos exames

colposcópicos com relação aos exames histopatológicos." Rev. bras. anal. clin **41**(2): 155-160.

Quezada, C. (2012). "5'-ectonucleotidase mediates multiple-drug resistance in glioblastoma multiforme cells." Journal of Cellular Physiology.

Rapose, A. (2009). "Human papillomavirus and genital cancer." Indian J Dermatol Venereol Leprol **75**(3): 236-243; quiz 243-234.

Rosa, M. (2007). Papilomavirus Humano e lesões do colo uterino. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.

Schiffman, M., N. Wentzensen, et al. (2011). "Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer." J Natl Cancer Inst **103**(5): 368-383.

Siddiqui, M. T., C. Cohen, et al. (2008). "Detecting high-grade cervical disease on ASC-H cytology: role of BD ProEx C and Digene Hybrid Capture II HPV DNA testing." Am J Clin Pathol **130**(5): 765-770.

Sowa, N. A., B. Taylor-Blake, et al. (2010). "Ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits nociception by hydrolyzing AMP to adenosine in nociceptive circuits." J Neurosci **30**(6): 2235-2244.

Stagg, J., P. A. Beavis, et al. (2012). "CD73-deficient mice are resistant to carcinogenesis." Cancer Res **72**(9): 2190-2196.

Stagg, J., U. Divisekera, et al. (2011). "CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis." Cancer Res **71**(8): 2892-2900.

Stella, J., L. Bavaresco, et al. (2010). "Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines." Urol Oncol **28**(3): 260-267.

Stevens, M. P., S. M. Garland, et al. (2007). "Comparison of the Digene Hybrid Capture 2 assay and Roche AMPLICOR and LINEAR ARRAY human papillomavirus (HPV) tests in detecting high-risk HPV genotypes in specimens from women with previous abnormal Pap smear results." J Clin Microbiol **45**(7): 2130-2137.

Supernat, A., A. Markiewicz, et al. (2012). "CD73 expression as a potential marker of good prognosis in breast carcinoma." Appl Immunohistochem Mol Morphol **20**(2): 103-107.

Swancutt, D. R., S. M. Greenfield, et al. (2008). "Women's colposcopy experience and preferences: a mixed methods study." BMC Womens Health **8**: 2.

Thompson, L. F., H. K. Eltzschig, et al. (2004). "Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia." J Exp Med **200**(11): 1395-1405.

Wang, K. L. (2007). "Human papillomavirus and vaccination in cervical cancer." Taiwan J Obstet Gynecol **46**(4): 352-362.

Wu, X. R., X. S. He, et al. (2012). "High expression of CD73 as a poor prognostic biomarker in human colorectal cancer." J Surg Oncol **106**(2): 130-137.

Yegutkin, G. G. (2008). "Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade." Biochim Biophys Acta **1783**(5): 673-694.

Yegutkin, G. G., F. Marttila-Ichihara, et al. (2011). "Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression." Eur J Immunol **41**(5): 1231-1241.

Zhang, B. (2010). "CD73: a novel target for cancer immunotherapy." Cancer Res **70**(16): 6407-6411.

Zhang, B. (2012). "CD73 promotes tumor growth and metastasis." Oncoimmunology **1**(1): 67-70.

## TABLES

Table 1: Age, parity, smoking, sexual partners and first sexual intercourse data in relation to squamous intraepithelial lesions.

<b>Groups</b>	<b>Age (years)</b>	<b>Parity (median)</b>	<b>Smoking (%)</b>	<b>Partners (0 - 3)</b>
NILM (n=23)	45.5 +- 13.1 years	2	17.4% (n=4)	73.9%
LSIL (n=16)	40.4 +- 13.7 years	2	6.2% (n=1)	81.2%
HSIL (n=18)	35.9 =- 14.4 years	5	33,3% (n=6)	44,40%

Legend: NILM: negative to intraepithelial squamous lesion or carcinoma; LSIL: low grade intraepithelial squamous lesion; HSIL: high grade intraepithelial squamous lesion.

Table 2: E-5'-NT median in different groups of cervical lesions

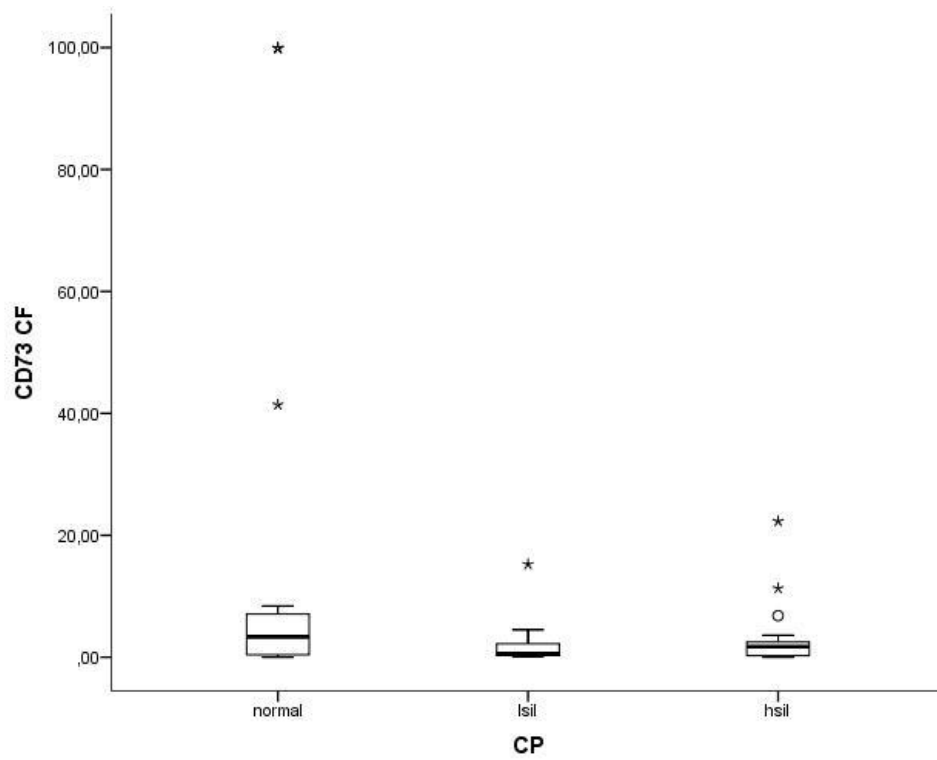
<b>Groups</b>	<b>NILM n=23</b>	<b>LSIL n= 16</b>	<b>HSIL n= 18</b>
<b>Median</b>	3,36	0,65	1,75
<b>P25 – P75</b>	0,35 - 7,34	0,27 - 2,32	0,24 – 2,77

Legend: NILM: negative to intraepithelial squamous lesion or carcinoma; LSIL: low grade intraepithelial squamous lesion; HSIL: high grade intraepithelial squamous lesion; P25: 25th percentile; P75: 75<sup>th</sup> percentile.



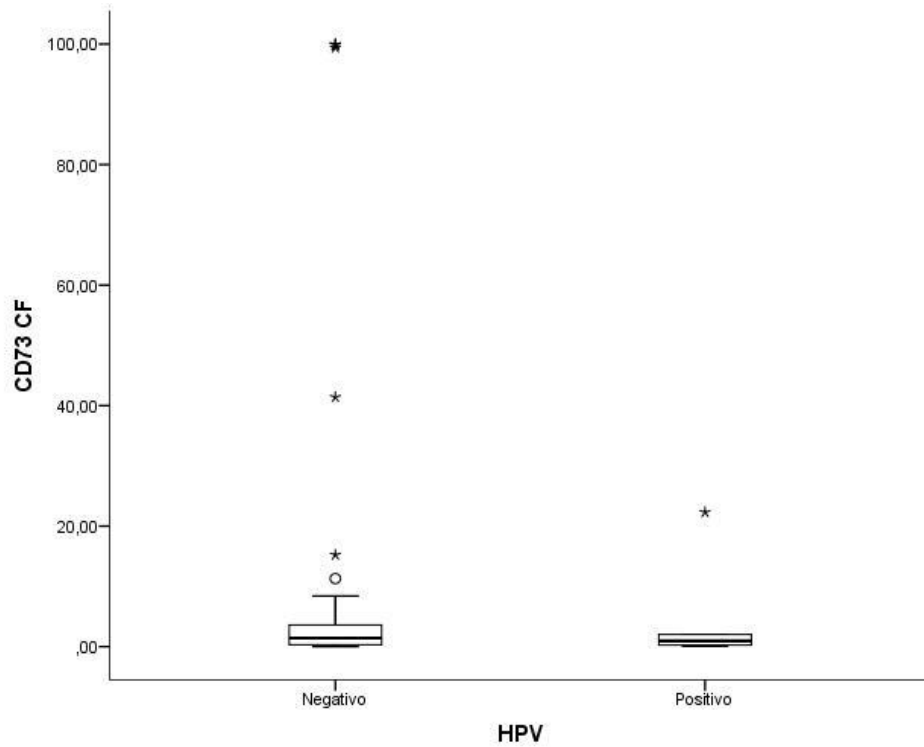
**FIGURES:**

Figure 1: Expression of E-5'-NT by flow cytometry in different groups (P value= 0,182)



Legend: LSIL: low grade intraepithelial squamous lesion; HSIL: high grade intraepithelial squamous lesion; CP: Pap smear and CD73 CF: ecto-5'-nucleotidase enzyme.

Figure 2: Expression of E-5'-NT by flow cytometry and its relationship with HPV (Pvalue = 0,534)



Legend: CD73 CF: ecto-5'-nucleotidase enzyme; HPV: papilloma virus human.

## CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer de colo uterino invasor e todas as suas lesões precursoras têm papel significativo na saúde da mulher devido à sua alta prevalência na população. São estimados anualmente ao redor de 500.000 novos casos com mais de 200.000 mortes. O HPV tem sido encontrado em praticamente todos os casos desse tipo de CC sendo um fator necessário para o desenvolvimento das lesões pré-cancerosas e posterior progressão ao câncer. Diversas moléculas têm sido estudadas com o intuito de desenvolver biomarcadores de prognóstico e valor preditivo em processos neoplásicos. A enzima ecto-5'-nucleotidase vem sendo estudada como biomarcador em diversas neoplasias, e já tem sido relacionada a vários tipos de tumor, como neoplasia de mama, glioma, glioblastoma, câncer de bexiga, entre outros. Observamos que a expressão desta enzima entre pacientes com lesões intraepiteliais escamosas de baixo e alto grau, quando comparadas com o grupo sem lesões, não apresentou diferença estatisticamente significativa. Do mesmo modo, quando comparamos essa enzima com a presença de HPV na amostra, também não observamos diferenças significativas entre os grupos.

Devido à importância dos achados atuais relacionando a E-5'-NT com progressão tumoral, metástases e mecanismos de escape do tumor, maiores estudos, com uma maior população amostral, incluindo casos de carcinoma cervical invasor, são necessários para avaliar e elucidar estas relações.