



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

GIWELLINGTON SILVA ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA ONCOPROTEÍNA E6, P16^{INK4a}, MMP-3 E
TIMP-2 NAS LESÕES PRECURSORAS E CÂNCER CERVICAL DE MULHERES
INFECTADAS PELO HPV DE ALTO RISCO ONCOGÊNICO**

RECIFE

2016

GIWELLINGTON SILVA ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA ONCOPROTEÍNA E6, P16^{INK4a}, MMP-3 E
TIMP-2 NAS LESÕES PRECURSORAS E CÂNCER CERVICAL DE MULHERES
INFECTADAS PELO HPV DE ALTO RISCO ONCOGÊNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas

Linha de Pesquisa: Modelos Morfofisiológicos e Imunológicos das Doenças

RECIFE

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

A345a Albuquerque, Giwellington Silva.
Avaliação imunohistoquímica da oncoproteína E6, P16^{INK4a}, MMP-3 e
TIMP-2 nas lesões precursoras e câncer cervical de mulheres infectadas
pelo HPV de alto risco oncogênico / Giwellington Silva Albuquerque. –
2016.
89 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Jacinto da Costa Silva Neto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Câncer de colo do útero. 2. Imuno-histoquímica. 3. Diagnóstico. I.
Silva Neto, Jacinto da Costa (Orientador). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-125)



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Centro de Ciências da Saúde - UFPE

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo

Fone/Fax: (81) 2126.8529

<http://www.ppgpatologiaufpe.com>

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.

AUTORA: Giwellington Silva Albuquerque

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Patologia

NOME DA DISSERTAÇÃO: **“Avaliação Imunohistoquímica da Oncoproteína E6, P16ink4, MMP-3 e TIMP-2 nas Lesões Precursoras e Câncer Cervical de Mulheres Infectadas pelo HPV de Alto Risco Oncogênico”.**

ORIENTADORA: Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

DATA DA DEFESA: 16 de fevereiro de 2016

DATA DA APROVAÇÃO: 16 de fevereiro de 2016

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Profa. Dra. Adrya Lúcia Peres Bezerra de Medeiros

Prof. Dr. Jaymesson Raphael Cardoso Vieira

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

R E I T O R

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE- REITOR

Prof^a. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof^a. Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof^a. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Lucas André Cavalcanti Brandão

SECRETÁRIA DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Margarete Valdevino da Silva

RECIFE

2016

AGREDECIMENTOS

A Deus, Pai e todo poderoso, que me ajuda a seguir meu caminho, sempre me dando a força necessária para vencer os obstáculos.

Aos meu pais, Nilva e Gilberto, que são o motivo da minha força, a quem por eles sou eternamente grato por tudo que sou. Amo-os com todo meu coração.

Ao meu orientador, Jacinto Costa, que vem me ajudando em toda minha vida acadêmica, sempre com muito prazer e paciência. Com quem aprendi a fazer ciência, e ao qual me orgulho de ter como orientador e amigo.

Aos meus irmãos Gisllayne e Giwesthonny, que amo imensamente e faço de tudo que posso para vê-los felizes e realizados, e aos quais peço desculpas pelos momentos de convivência que tive que me ausentar.

A Tia Nilma, pela força, pelas palavras, por demonstrar todo amor e orgulho que tem por mim. Pelas mensagens que me manda e que me fazem sempre muito bem.

A toda minha família por sempre torcer e acreditar em mim.

Aos meus amigos, que são poucos, mas que são os melhores. Que são a minha família longe de casa, que sempre me acolhem e torcem muito pelas minhas vitórias.

A meu amigo, e irmão que a vida me deu, Jailton Lobo, por toda sua amizade, força e paciência. Muito obrigado por todos os seus conselhos e por não me deixar desistir nos meus momentos de fraqueza. Te devo muito meu irmão.

Ao pessoal do Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares (LPCM), meus amigos de experimentos, os quais aprendi muita coisa, e os quais compartilhamos muitos momentos de dúvidas, incertezas, apreensão... mas também momentos de felicidades e vitórias.

Ao meu co-orientador, pela disponibilidade do laboratório para a realização dos experimentos.

A minha turma de mestrado, que fizeram da turma a melhor que eu podia participar, onde, com cada um eu aprendi algo para me tornar melhor. Agradeço pelas experiências de vida que foram me passadas por vocês e por toda amizade que construímos.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia, na figura da professora Manuela Figueiroa, da secretária Margarete Valdevino e da técnica Silvana Paes, por acompanhar a nossa estada no programa sempre com muita paciência e dedicação, ajudando-nos a progredir.

Aos professores do mestrado, pela importantíssima contribuição na minha formação.

Ao Hospital das Clínicas, na figura da Dr. Mariléa Guimarães, pelo fornecimento das amostras utilizadas para o desenvolvimento deste projeto.

A banca examinadora pela disponibilidade e por contribuir para o fechamento desse ciclo.

A Capes e Facepe pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização dessa pesquisa.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito, assim não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

O Câncer de colo uterino é o quarto mais comum em mulheres no mundo. Sabe-se que a carcinogênese cervical precede da infecção e persistência do Papilomavírus humano (HPV), o qual tem a capacidade de se integrar ao genoma do hospedeiro introduzindo os genes E6 e E7. O produto desses genes, as oncoproteínas E6 e E7 perturbam o ciclo celular promovendo superexpressão da proteína p16^{INK4a} e as metaloproteinases de matriz (MMP), que são moléculas capazes de promover a progressão das lesões cervicais uterinas. Nesse intuito, o presente estudo avaliou a expressão da oncoproteína E6, p16^{INK4a}, metaloproteinase de matriz 3 (MMP-3) e inibidor tissular de metaloproteinase 2 (TIMP-2) nos diferentes graus de lesões e câncer cervical, associando com a presença do HPV e seus genótipos. Foram utilizadas 86 amostras de escovado cervical e de fragmentos de biopsias de mulheres que foram diagnosticadas citologicamente com lesões cervicais intraepiteliais e invasivas. Todas as amostras foram genotipadas e submetidas a técnica de imunohistoquímica para a identificação da oncoproteína E6-HPV16/18, p16^{INK4a}, MMP-3 e TIMP-2. O perfil genotípico identificou o HPV16 (44,4%) como o mais prevalente, seguido por HPV31 (30,3%), HPV58 (15,1%), HPV18 (6,1%) e HPV33 (4,1%). A reação imunohistoquímica para E6 se mostrou mais intensa nos casos de invasão, assim como p16^{INK4a}. Entretanto MMP-3 e o TIMP-2 se mostraram mais reativos em lesões pré-malignas. Portanto, este estudo mostra maior prevalência do HPV-16 em mulheres atendidas no Hospital das Clínicas – UFPE e sugere que a oncoproteína E6 e a proteína p16^{INK4a} são biomarcadores úteis para aumentar a precisão do diagnóstico precoce de câncer de colo do útero. Contudo, em lesões pré-malignas os biomarcadores clinicamente úteis seriam MMP-3 e TIMP-2.

Palavras-chave: Câncer de colo do útero. Imuno-histoquímica. Diagnóstico

ABSTRACT

Cervical cancer is the fourth most common in women worldwide. Cervical carcinogenesis is known to precede the infection and persistence of human papillomavirus (HPV), which has the ability to integrate into the host genome by introducing the E6 and E7 genes. The product of these genes, E6 and E7 oncoproteins disrupt the cell cycle promoting overexpression of p16INK4a protein and matrix metalloproteinases, molecules which are able to promote the progression of cervical uterine injury. To that end, the present study aimed to evaluate the expression of the oncoprotein E6, p16INK4a, matrix metalloproteinase 3 and the tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in varying degrees of injuries and cervical cancer, associated with the presence of HPV and its genotypes. 86 cervical brush samples were used and biopsies fragments of women who were diagnosed cytologically with intraepithelial cervical lesions and invasive. All samples were genotyped and subjected to immunohistochemistry to identify the oncoprotein E6, HPV16 / 18, p16INK4a, MMP-3 and TIMP-2. The genotype profile identified HPV16 (44.4%) was the most prevalent, followed by HPV31 (30.3%), HPV58 (15.1%), HPV18 (6.1%) and HPV33 (4.1%). The immunohistochemical reaction for E6 was more reactive in the case of invasion, as well as p16INK4a. However MMP-3 and TIMP-2 were more reactive in premalignant lesions. Therefore, this study showed a higher prevalence of HPV-16 in women treated at the Hospital - UFPE and suggests that the E6 oncoprotein and p16INK4a protein biomarkers are useful to improve the accuracy of early diagnosis of cervical cancer. However, in premalignant lesions would be clinically useful biomarkers MMP-3 and TIMP-2.

Keywords: Uterine Cervical Neoplasms. Immunohistochemistry. Diagnosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Genoma do HPV.	19
Figura 2. O Ciclo viral e a transformação neoplásica induzida pelo HPV.	21
Figura 3. Infecção pelo HPV e a progressão das lesões pré-cancerosas até o câncer cervical.....	23
Figura 4. Domínios estruturais das classes de MMPs.....	30
Figura 5. Expressão de metaloproteinases da matriz (MMPs) e seus inibidores tissulares (TIMPs) nas interações tumor-estroma.	32
Figura 6. Mecanismo de ação da oncoproteína E6.	37
Figura 7. Mecanismo de ação da oncoproteína E7.	38
Figura 8. Software Image J.....	52
Figura 9. Plugin IHC Tool Box.	52
Figura 10. Histograma.	52

Artigo Original

Figura 1. Perfil genotípico do HPV	63
Figura 2. Imunohistoquímica representativa para as proteínas MMP-3, TIMP-2, p16 ^{INK4a} e E6.....	65
Figura 3. Imunohistoquímica para a oncoproteína E6 HPV-16/18 em NIC1 (A), NIC2 (B), NIC3 (C) e Câncer (D).	67
Figura 4. Imunohistoquímica para a proteína p16 ^{INK4a} em NIC1 (A), NIC2 (B), NIC3 (C) e Câncer (D).	68
Figura 5. Imunohistoquímica para o TIMP-2 em NIC1 (A), NIC2 (B), NIC3 (C) e Câncer (D).	68
Figura 6. Imunohistoquímica para a MMP-3 em NIC1 (A), NIC2 (B), NIC3 (C) e Câncer (D).	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação estrutural das MMPs.	31
--	----

Artigo Original

Tabela 1. Resultados e relação entre o primeiro e o segundo exame citológico	62
Tabela 2. Correlação dos resultados discordantes entre o exame Citológico e o Histopatológico.....	63
Tabela 3. Relação genotipagem com o diagnóstico histológico.....	64
Tabela 4. Relação Imunohistoquímica X Positividade para Lesão	66
Tabela 5. Relação Imunohistoquímica X Citologia.....	66
Tabela 6. Relação Imunohistoquímica X Histologia.....	66
Tabela 7. Relação Imunohistoquímica X Tipo de HPV	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag-Ac Antígeno-Anticorpo

ASC-H Atipia celular de significado indeterminado não podendo se excluir uma lesão de alto grau

ASC-US Atipia Escamosa de Significado Indeterminado

BSA Soro Albumina Bovina

CAF Cirurgia de alta frequência

CC Câncer Cervical

CDK Ciclina Dependente de Quinase

CNS Conselho Nacional de Saúde

DAB Diaminobenzidina

DNA Ácido Desoxiribonucleico

dNTP Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

E1, E2, E4, E5, E6 e E7 Proteína Viral Precoce do HPV 1, 2, 4, 5, 6 e 7

E2F Fator de Transcrição E2F

E6AP Ubiquitina celular ligase associada à proteína

HC Hospital das Clínicas

HIV Vírus da Imunodeficiência Humana

HPV Papiloma Vírus humano

HRP Horseradish Peroxidase

HSIL Lesão Intraepitelial de Alto grau

INCA Instituto Nacional de Câncer

IRF Fator Regulador de Interferon

L1 e L2 Proteína tardias do HPV codificante do capsídeo viral 1 e 2

LabCen/CCB Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas

LCR Região de Controle Longo

LPCM Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares

LSIL Lesão Intraepitelial de Baixo grau

MEC Matriz Extracelular

MMP Metaloproteinase de Matriz

MY09/11 Primer específico para identificação do HPV

NIC Neoplasia intraepitelial cervical

nm nanômetro

ORF Fases de Leitura Aberta

p16^{INK4a} Proteína inibidora de quinase 4 dependente de ciclina (de massa 16 kDa)

p53 Proteína de massa de 53 kda, supressora de tumor

PBS Tampão Fosfato-salina

PCR Reação em cadeia da Polimerase

pRB Proteína do Retinoblastoma

RECK Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs

RNA_m Ácido Ribonucleico mensageiro

SISCOLO Sistema de Informação do câncer do colo do útero

SUS Sistema Único de Saúde

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERT Transcriptase Reversa da Telomerase

TIMP Inibidores Tissulares de Metaloproteinases

UFPE Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	O HPV E O SEU CICLO	19
2.2	PROGRESSÃO DAS LESÕES CERVICAIS	22
2.3	DIAGNÓSTICO DO CÂNCER CERVICAL	24
2.3.1	Citologia oncótica	24
2.3.2	Colposcopia.....	25
2.3.3	Histopatologia.....	26
2.3.4	Testes auxiliares.....	27
2.3.4.1	Reação em Cadeia da Polimerase – PCR	27
2.3.4.2	Imunohistoquímica	28
2.4	METALOPROTEINASES DE MATRIZ	29
2.4.1	Metaloproteinase de Matriz – 3 (MMP-3).....	33
2.5	INIBIDORES TISSULARES DE METALOPROTEINASES - TIMP2.....	35
2.6	ONCOPROTEINA E6	36
2.7	P16 ^{INK4a}	38
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4	METODOLOGIA.....	41
4.1	TIPO DE ESTUDO.....	41
4.2	ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	41
4.3	LOCAL DE ESTUDO	41
4.4	POPULAÇÃO ALVO E PERÍODO	43
4.5	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	43
4.6	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	44
4.7	MÉTODOS DE COLETA	44
4.7.1	Serviço de atendimento do Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares.....	44
4.7.1.1	Coleta Citológica	45

4.7.2 Serviço de atendimento do Setor de Colposcopia do Hospital das Clínicas da UFPE	45
4.7.2.1 Coleta Citológica	46
4.7.2.2 Coleta de Biopsias	47
4.8 DETECÇÃO DO DNA DO HPV	48
4.8.1 Extração de ácidos nucleicos	48
4.8.2 Detecção do DNA do HPV	49
4.9 GENOTIPAGEM DO HPV POR PRIMERS ESPECÍFICOS	50
4.10 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA MMP3, TIMP2, E6 E p16 ^{INK4a}	51
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
5. RESULTADO - ARTIGO CIENTÍFICO - AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA ONCOPROTEÍNA E6, P16^{INK4a}, MMP-3 E TIMP-2 NAS LESÕES PRECURSORAS E CÂNCER CERVICAL DE MULHERES INFECTADAS PELO HPV DE ALTO RISCO ONCOGENICO	54
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICE	85
ANEXO	86

1 INTRODUÇÃO

As estimativas mundiais em relação à ocorrência do câncer de colo do útero apontam este problema como sendo o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres, excetuando o câncer de pele não melanoma, com o desenvolvimento de 527.624 novos casos diagnosticados e 265.653 óbitos no ano de 2012. Desta forma, caracterizando-o como um importante problema de saúde pública (GLOBOCAN, 2012).

As maiores incidências de casos de câncer cervical (CC) estão em países em desenvolvimento, que detêm 85% dos casos (BRUNI et al, 2010). No Brasil, a última estimativa mostra esta neoplasia como a terceira mais frequente em mulheres, sendo estimados 16.340 novos casos para o ano de 2016 (INCA, 2015).

A principal causa relacionada como o desenvolvimento dessa patologia é a infecção persistente pelo Papilomavírus humano (HPV, do inglês, Human Papillomavirus), estando ele presente em mais de 99% de todos os carcinomas cervicais (DOORBAR, 2006; JOHANSSON, SCHWARTZ, 2013). Já se tem 40 desses vírus como responsáveis por infecções do trato anogenital (DE VILLIERS et al, 2004). Os HPV são comumente classificados em grupos de baixo e alto risco (ZUR HAUSEN, 2002), de provável alto risco e de risco indeterminado, de acordo com o seu potencial oncogênico (MUÑOZ et al, 2003).

Já se está comprovado que os HPVs de alto risco são os responsáveis pelo desenvolvimento carcinogênico no colo do útero, visto que, a infecção persistente por mais de 2 anos desses vírus, resulta na expressão dos genes virais transformantes E6 e E7, cujos produtos proteicos interferem na regulação

do ciclo celular e ocasionam instabilidade genômica nas células infectadas (ZUR HAUSEN, 2002; PITTAYAKHAJONWUT; ANGELETTI, 2010). Não havendo intervenção, o DNA viral se integrará ao DNA do hospedeiro levando ao desenvolvimento de lesões a nível celular, chegando a lesões NIC 2 e NIC 3 após 2-3 anos da infecção e iniciando-se a transformação carcinogênica entre 10 e 12 anos (WALLIN et al, 1999; ZIELINSKI et al, 2001; WINER et al, 2005).

O rastreamento de lesões pré-cancerosas do colo do útero faz com que esse câncer seja um dos tipos que apresentam uma das mais altas taxas de cura (INCA, 2014), porém, apesar do progresso no rastreamento de mulheres com doença cervical, um elevado número de resultados falso-negativos e falso-positivos é observado. Isso evidencia a necessidade de se identificar biomarcadores clinicamente úteis para aumentar a precisão do diagnóstico e fornecer informações quanto ao risco de progressão para uma lesão mais severa (DEHN et al, 2007; HWANG, SHROYER, 2012).

Diversos cânceres humanos estão sendo estudados e os pesquisadores tentam encontrar maneiras precoces de diagnóstico, nesse sentido, a família de metaloproteinases de matriz (MMPs, do inglês, *Matrix Metalloproteinases*) e seus inibidores, assim como as proteínas ligadas ao ciclo celular, tem sido exploradas como importantes ferramentas na detecção precoce, prognóstico e indicadores de metástase (ROY et al, 2009).

Tendo em vista a importância de rastreamento eficiente para a detecção precoce, melhor diagnóstico e melhor tratamento para o câncer cervical, o presente estudo analisou a presença e superexpressão das metaloproteinases da matriz três (MMP-3), inibidor tissular de metaloproteinases dois (TIMP-2), proteína de ciclo celular p16^{INK4a} e oncoproteína E6 do HPV de alto risco do tipo

16 e 18 em amostras citológicas cervicais de mulheres que apresentam desde alterações citológicas mínimas até a invasão, a fim de estabelecer um perfil biomarcador imunohistoquímico que contribua com um melhor prognósticos das lesões cervicais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O HPV E SEU CICLO

Pertencentes à família Papovaviridae, o Papilomavírus é um vírus com diâmetro variando de 44 a 55nm, estrutura icosaédrica não envelopada composta por um capsídeo consistindo de 72 capsômeros, possuem o material genético covalentemente fechado formado por uma dupla fita de DNA com aproximadamente 8000 pares de bases que está dividido em uma região codificante, com oito fases de leitura aberta (ORF, do inglês, *Open Reading Frames*) que codificam as proteínas precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7, do inglês, *Early*) e as proteínas tardias (L1 e L2, do inglês, *Late*), e outra região não codificante chamada LCR (do inglês, *Long Control Region*), implicada no controle da replicação do DNA viral e da transcrição dos genes virais (Figura 1) (ZUR HAUSEN, 1999; BURN, 2003).

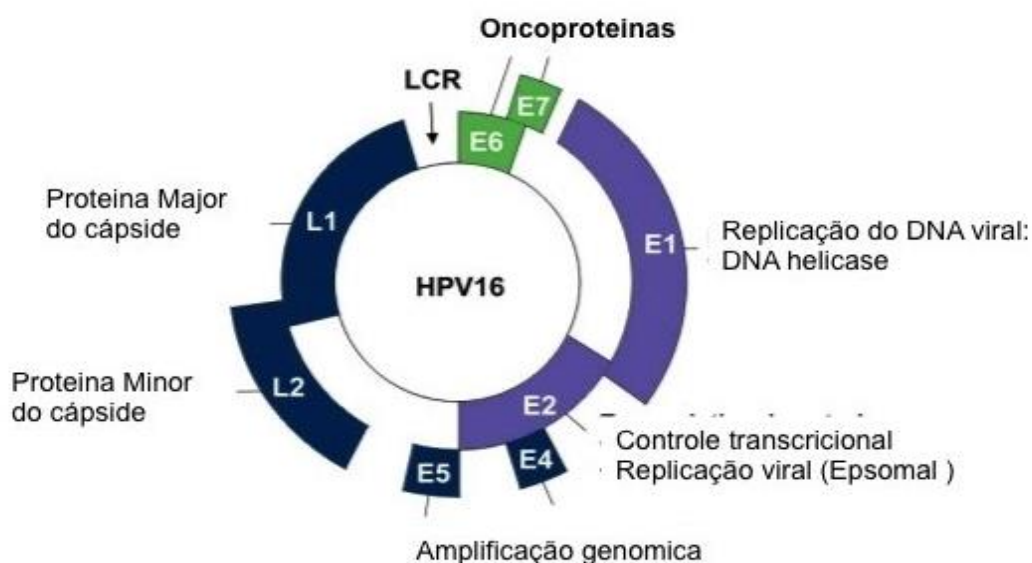


Figura 1. Genoma de HPV. Genoma de DNA circular de dupla-fita, mostrando a localização dos genes. Adaptado de D'Abramo CM, Archambault J. (2011).

O vírus HPV penetra no tecido através de microlesões no epitélio aonde chegam até as células basais, estas possuem receptores de membrana que reconhecem as proteínas do capsídeo viral, sendo posteriormente o vírus internalizado por um processo de fagocitose (EVANDER et al, 1997). Após o desnudamento do capsídeo, o DNA viral é transportado para o núcleo, seguindo a rede proteica do citoesqueleto (microtúbulos) (ZUR HAUSEN, 1996). Esse processo é importante para o ciclo viral, pois o vírus necessita de mecanismos da célula para completar seu desenvolvimento. O ciclo biológico do HPV está totalmente ligado ao das células epiteliais hospedeiras, os queratinócitos, onde a replicação viral acompanha a diferenciação e a maturação, sendo nas camadas superiores do epitélio em que se encontra maior atividade replicativa e maior quantidade de partículas virais (MOODY et al, 2010).

Os genomas do HPV, agora replicados, se distribuem em cada célula filha. À medida que as células epiteliais se diferenciam, há uma amplificação do DNA viral; e quando fatores implicados na diferenciação celular ativam a transcrição dos genes virais tardios, ocorre então a expressão das proteínas virais L1 e L2 nas camadas mais superficiais do epitélio, permitindo a formação da cápsula do genoma viral. Os novos vírions infectantes finalmente são liberados no meio exterior com as células descamativas, completando o ciclo do vírus (Figura 2) (ZUR HAUSEN, 1996; DOORBAR, 2005).

O ciclo viral é extremamente dependente da diferenciação dos queratinócitos. Para manutenção das células em ciclo, as proteínas virais E6 e E7 são expressas em taxas muito baixas, inibidas pela proteína viral E2. Quando, em situação adversa à sua história natural, há uma quebra do genoma viral nas regiões codificantes E1 e E2, ocorre desregulação e consequente

superexpressão dos genes E6 e E7. Estes codificam proteínas que irão atuar degradando proteínas celulares responsáveis por levar a célula a apoptose e em genes supressores de tumor, induzindo as células infectadas a um estímulo excessivo de proliferação, o que resulta em instabilidade cromossômica, aneuploidia e modificações no DNA da célula infectada. Na sequência, o DNA viral integra-se ao DNA celular, iniciando a transformação neoplásica (ZUR HAUSEN, 2002).

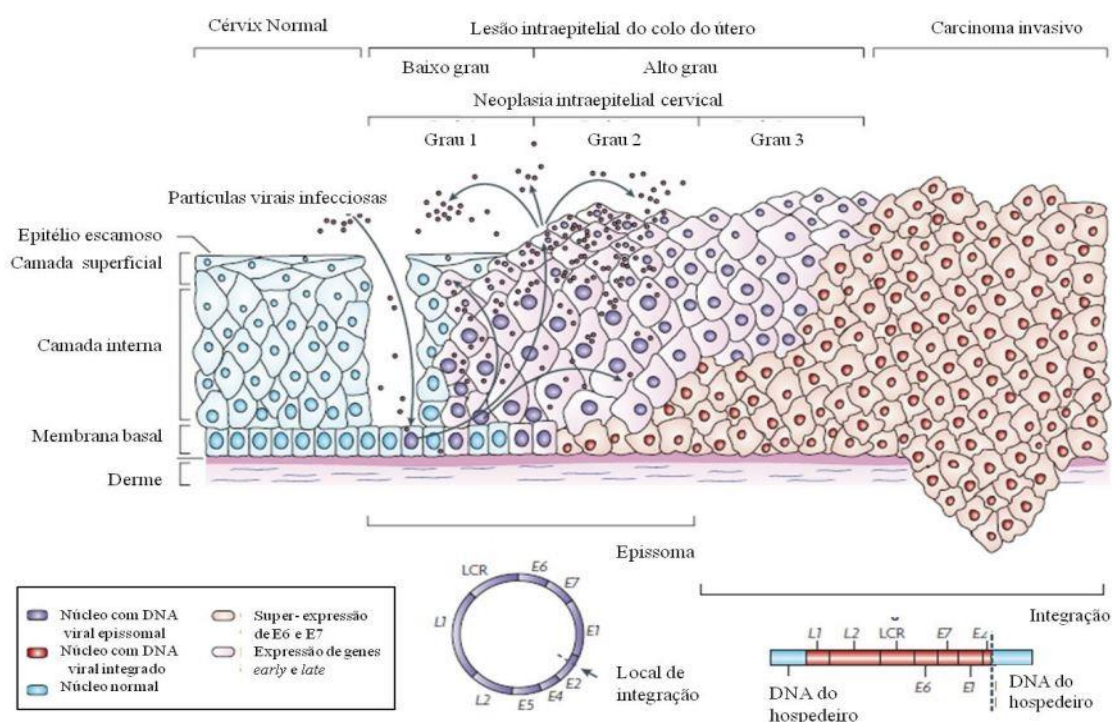


Figura 2. O ciclo viral e a transformação neoplásica induzida pelo HPV. Fonte: Adaptado de Woodman, Collins e Young (2007).

A perda da capacidade de completar o ciclo é o que diferencia a infecção viral produtiva, presente nas lesões de baixo grau, de uma infecção viral transformante e tumoral, característica dos HPVs de alto risco. O desenvolvimento de neoplasia intraepitelial de grau maior e de câncer cervical (CC) está associado com a perda da regulação deste ciclo reprodutivo do HPV (DOOBAR, 2005).

A maioria das infecções é controlada por mecanismos que não foram ainda perfeitamente elucidados. A eliminação viral é feita entre 3 e 16 meses, variando de acordo com os genótipos considerados. O *clearance* dos HPVs de baixo risco é da ordem de 3 a 6 meses, enquanto que os de alto risco é de 12 a 16 meses. Em certos casos, a infecção pode ficar latente e ser reativada em um período de imunossupressão. A infecção por HPV de alto risco resulta em progressão para CC apenas em uma pequena percentagem de mulheres, após um longo período de latência (ZUR HAUSEN, 1996; HO et al, 1998).

Estudos mostram que a superexpressão de algumas proteínas, como a p16^{INK4a}, pode ser utilizada para estimar a evolução e extensão da lesão e auxiliar na diminuição das variações diagnósticas inter-observadores. A proteína p16^{INK4a}, inibidora de quinase 4, é uma reguladora da divisão celular, superexpressa pela presença da oncoproteína E7 do HPV. Sua expressão é observada em núcleos e citoplasmas de células displásicas do epitélio escamoso, assim como em carcinomas (RAJCANI et al, 2009; BERGERON et al., 2010; MISSAOUI et al, 2010).

2.2 PROGRESSÃO DAS LESÕES CERVICAIS

A integração viral, situação necessária para a transformação maligna das células por torná-las imortalizadas, não acontece em todos os casos, e o genoma viral é mantido em sua forma episomal. Desse modo, um grande número de mulheres portadoras do HPV, mesmo dos tipos oncogênicos, não desenvolvem doença ou desenvolvem lesões que regredem ou se estabilizam em estágios pré-invasivos (HO et al, 1998; ZUR HAUSEN, 1999; STEBEN, DUARTE-FRANCO,

2007). Não está claro ainda porque apenas um pequeno percentual de mulheres infectadas pelo HPV desenvolve lesões pré-malignas que podem evoluir a invasão. A susceptibilidade individual e outros fatores podem ter um papel relevante sobre o desenvolvimento de lesões, e o sistema imune parece ter a regência na resolução da infecção (FRAZER, 2007; STEBEN, DUARTE-FRANCO, 2007).

Sabe-se que a integração viral é uma etapa chave para a carcinogênese cervical, devido às alterações do ciclo celular produzidas pela expressão dos genes virais E6 e E7 e inibição de genes supressores de tumor nas células do hospedeiro. É a expressão contínua e concomitante desses dois genes que está na origem da immortalização das células infectadas e, de fato, há um aumento da detecção de RNAm de E6 e E7 em lesões de alto grau e carcinoma cervical (DUENSING, MÜNGER, 2003; CATTANI et al, 2009).

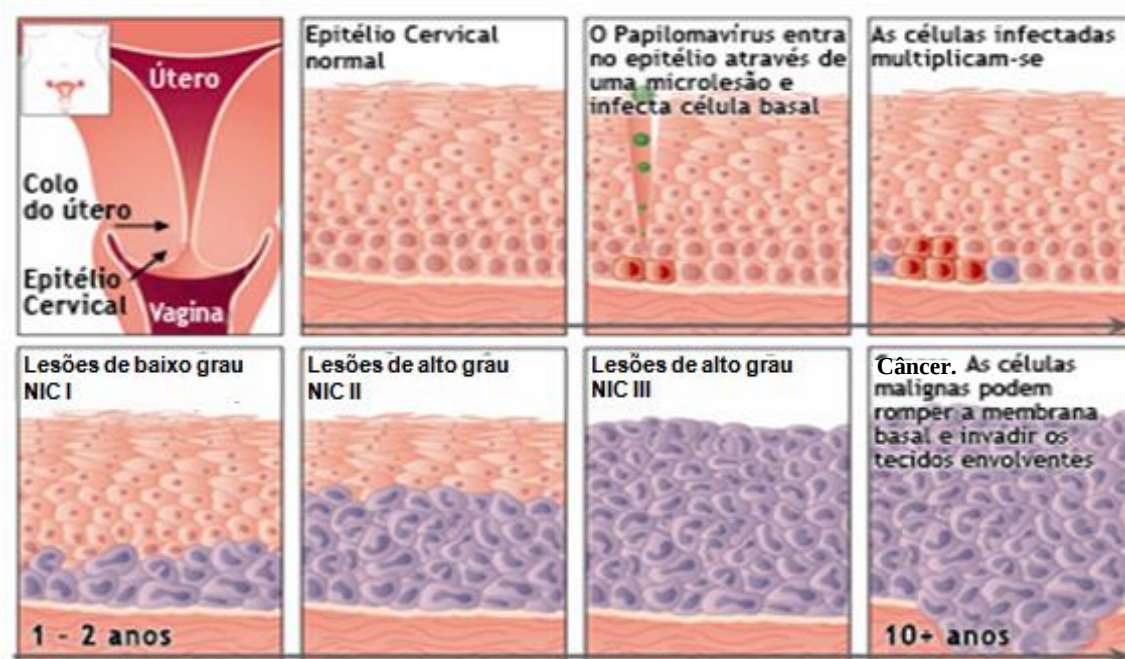


Figura 3. Infecção pelo HPV e progressão das lesões pré-cancerosas até o câncer cervical.
Fonte: Adaptado de Silva et al, 2008.

Lesões intraepiteliais (pré-malignas), quando não tratadas, podem progredir a lesões invasivas (malignas). As alterações dessas lesões podem ser detectadas pelo exame citológico e histológico, sendo classificadas através da nomenclatura: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau I (NIC-I), que na citologia é conhecida como Lesão Intraepitelial de Baixo Grau (LSIL); Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau II e III (NIC-II e III), conhecida na citologia como Lesão Intraepitelial de Alto Grau (HSIL); carcinoma escamoso e adenocarcinoma *in situ* e invasor (Figura 3) (SOLOMON, 2002).

2.3 DIAGNÓSTICO DAS LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS E DO CÂNCER CERVICAL

Apesar da alta morbidade e mortalidade do câncer de colo uterino, as lesões pré-cancerosas podem ser facilmente detectadas e baseiam-se em um tripé diagnóstico: o exame citológico de rastreio (mais conhecido como exame de Papanicolaou), o colposcópico e o histopatológico (BOICEA et. al, 2012).

2.3.1 Citologia oncótica

A citologia oncótica foi inicialmente desenvolvida no início do século XX pelo Greco-americano George N. Papanicolaou e o patologista romeno Aureli Babès, os primeiros a relatar a presença de células cancerosas em esfregaços vaginais e cervicais. Esses dois pesquisadores não se conheciam e desenvolveram seus estudos separadamente e ambos apresentaram seus trabalhos em 1928 (KOSS, GOMPEL, 2006).

Vários autores corroboraram com as descobertas feitas a cerca do câncer de colo uterino e a citologia, como Meigs et al (1943), Ayre (1944) e Jones et al (1945). Foi Ayre inclusive que aprimorou a técnica de coleta fazendo um raspado direto da cérvix com o uso de uma espátula cervical, espátula de Ayre, que avalia uma amostragem celular da ectocérvice e endocérvice, locais de maior frequência de aparecimento de atipias e lesões intraepiteliais pré-invasivas.

Atualmente, a classificação dos resultados dos exames citológicos utiliza a nomenclatura do Sistema Bethesda (2001), um conjunto de nomenclaturas envolvendo a avaliação da citologia baseada nas características celulares com o objetivo de facilitar a conclusão do laudo citológico e assim diminuir as variações interobservador. Esse sistema classifica as anormalidades do epitélio escamoso cervical em lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial de alto grau (HSIL), atipias celulares de significado indeterminado (ASC-US), atipias celulares de significado indeterminado não podendo se excluir uma lesão de alto grau (ASC-H) e carcinoma invasor queratinizante ou não queratinizante (SILVA NETO, 2012).

Alterações na descrição das anormalidades do epitélio glandular também foram incorporadas com a mesma finalidade dos critérios das células escamosas. Classificando-se em: atipia glandular endocervical, atipia glandular endometrial, adenocarcinoma endocervical *in situ*, adenocarcinoma invasor e adenocarcinoma endometrial (SOLOMON, NAYAR, 2005).

2.3.2 Colposcopia

Na presença de alguma anormalidade no esfregaço cervicovaginal, o exame colposcópico é indicado para que a avaliação macroscópica do colo uterino possa ser feita. Além da retirada de um fragmento do tecido (biópsia) para que o estudo histopatológico do tecido confirme o grau de comprometimento da lesão (GREENBERG, 2002).

A colposcopia é mais do que um elo entre o rastreio citológico e a confirmação da histologia. Ela avalia características que auxiliam na conclusão final do diagnóstico do câncer cervical. Particularidades das lesões são analisadas, como: tonalidade e intensidade aceto-branca, contorno da margem e superfície das áreas aceto-brancas, padrão vascular e permanência do iodo. Tendo melhor eficiência em diferenciar as lesões de baixo grau das de alto grau (BOONLIKIT, 2011).

2.3.3 Histopatologia

O fragmento tecidual obtido pelo colposcopista é analisado no exame histopatológico, ou biópsia, considerado o padrão ouro para o diagnóstico do câncer cervical (WU et. al, 2005). As lesões pré-cancerosas do colo do útero demonstram um amplo espectro de alterações nos cortes histológicos: anomalias nucleares, alteração da diferenciação celular, atividade mitótica e estratificação do epitélio (KOSS, GOMPEL, 2006).

O sistema de nomenclatura adotado foi desenvolvido por Richart em 1967, que sugeriu que todas as lesões pré-neoplásicas poderiam evoluir para o câncer invasivo. Podendo então serem agrupadas em neoplasias intraepiteliais

cervicais (NIC), que de acordo com o grau progressivo de comprometimento epitelial podem ser divididos em NIC I, NIC II e NIC III (KOSS, GOMPEL, 2006).

2.3.4 Testes auxiliares

A citologia ainda hoje é o principal método de rastreamento do câncer cervical. Mas com o desenvolvimento da biologia molecular nos últimos anos, o diagnóstico do câncer de colo uterino pode ser mais preciso em relação ao grau de desenvolvimento e prognóstico das lesões cervicais. Alguns testes de biologia molecular foram implementados como técnicas alternativas para o auxílio do diagnóstico dessas lesões, como por exemplo, a Imunohistoquímica e a PCR (KANESHIMA et. al, 2001; PIRES-ALVES et. al, 2004; NISHIWAKI et. al, 2008). Essas técnicas apresentam mais sensibilidade que o exame de Papanicolaou, por exemplo na busca da presença do HPV, podendo assim monitorar as pacientes que podem vir a desenvolver e progredir com lesões intraepiteliais (TERMINI, VILLA; 2008).

Contudo, essas metodologias apresentam algumas limitações diagnósticas, a principal consiste de que essas técnicas apresentam menos especificidade, devido ao fato de que elas não podem separar uma infecção transiente de uma infecção persistente e só mais tarde são associadas com um aumento do risco de uma lesão de alto grau e o câncer (CUZICK et. al, 2012).

2.3.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Este é um método que se utiliza da síntese enzimática de DNA, determinando amplificação específica e exponencial de um determinado fragmento desse ácido nucleico milhões de vezes. A técnica de PCR utiliza-se de enzima capaz de sintetizar DNA a partir de apenas uma cópia dessa molécula em reação que inclui aquecimentos e resfriamentos sucessivos. A realização dessa reação na presença de “primers” ou sequências iniciadoras específicas para um determinado tipo viral permite a amplificação do DNA desejado, mesmo que presente em quantidades ínfimas (SILVA et al, 2004).

Essa técnica é utilizada na prática diária para detecção de DNA do HPV assim como na tipagem viral. Nos casos de pesquisa de HPV envolvidos com o câncer cervical, a realização dessa técnica pode ser utilizada com amostras de escova endocervical, lavado vaginal, fragmento de biópsia fresco ou bloqueado em parafina.

2.3.4.2 Imunohistoquímica

Desenvolvida em 1941 por Coons e colaboradores, baseia-se no princípio da ligação antígeno-anticorpo (Ag-Ac) conjugado a um marcador cromógeno. O valor prático dessa técnica reside na identificação de várias estruturas celulares a nível funcional e morfológico sem provocar nenhum tipo de dano a ligação estabelecida entre o anticorpo e o antígeno. Propiciando a observação microscópica de onde se encontra o anticorpo e, conseqüentemente, o antígeno analisado. Pode ser aplicada para fins diagnósticos, prognósticos, indicação terapêutica e estudo de doenças infecciosas e outras doenças (FERRO, 2010).

Esta técnica pode ser útil na identificação precoce, diagnóstico, prognósticos e tratamento das lesões pré-neoplásicas e do câncer cervical por poder identificar e quantificar qualitativamente proteínas que apresentam o seu perfil de expressão alterado nos casos dessas lesões e ou carcinomas, como por exemplo, as metaloproteinases da matriz, os inibidores tissular de metaloproteinases, as proteínas de ciclo celular e até mesmo as oncoproteína do HPV.

2.4 METALOPROTEINASES DE MATRIZ

As Metaloproteinases da matriz (MMP) pertencem a uma família de endopeptidases zinco-dependentes com capacidade de degradar componentes da matriz extracelular (MEC), indicando serem integrantes fundamentais no processo de progressão das lesões tumorais (ROY et al, 2009; LIBRA et al, 2009).

A maioria dos membros da família das MMP estão organizados em três domínios básicos distintos e bem conservadas com base em considerações estruturais: um pró-peptídeo terminal amino; um domínio catalítico; e um domínio semelhante a hemopexina no terminal carboxi. O pró-peptídeo consiste de cerca de 80-90 aminoácidos que contêm um resíduo de cisteína, que interage com o átomo de zinco catalítico, a remoção desse pró-peptídeo resulta na ativação das metaloproteinases. O domínio catalítico contém dois íons de zinco e pelo menos um íon de cálcio coordenados para diferentes resíduos. O íon zinco catalítico é essencial para a atividade proteolítica das MMPs. O domínio semelhante a hemopexina tem mostrado desempenhar um papel funcional no

substrato de ligação e/ou de interações com os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (Figura 4) (STERNLICHT; WERB, 2001).

De acordo com seus substratos, as MMPs são divididas em subclasses distintas: collagenases (MMP-1, -8 e -13), gelatinases (MMP-2 e -9), estromelinas (MMP-3 e -10), matrilisinas (MMP-7 e -26) e tipo membrana (MMP-14, -15, -16, -17 e -24) (Tabela 1). A atividade dessas enzimas é especificamente inibida pelos TIMPs (do inglês, *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*), que podem ser de quatro tipos: TIMP-1, -2, -3 e -4 (EGEBLAD; WERB, 2002).

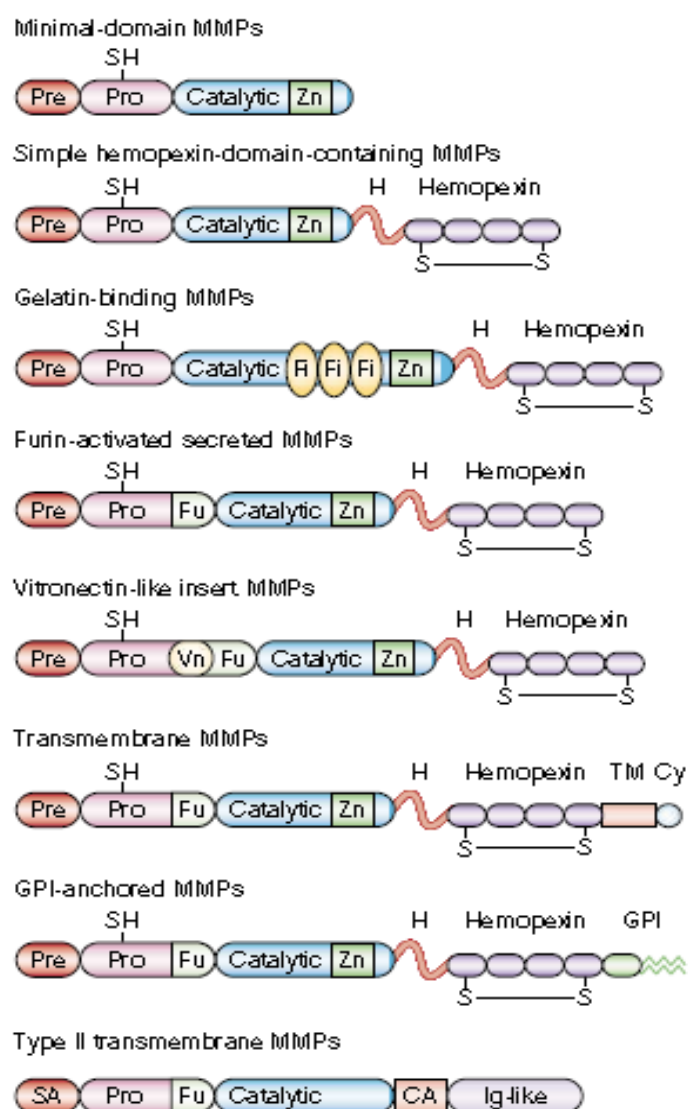


Figura 4. Domínios estruturais das classes de MMPs, Fonte: Nat Rev Cancer. 2002 Mar;2(3):161-74.

Tabela 1 – Classificação estrutural das MMPs.

	Classe estrutural	MMP	Nome comum
A	MMPs de domínio mínimo	MMP-7	Matrilisina
		MMP-26	Matrilisina-2
		MMP-1	Colagenase-1
		MMP-3	Estromelisina-1
		MMP-8	Colagenase-2 (Colagenase de neutrófilo)
		MMP-10	Estromelisina-2
		MMP-12	Metaloelastase
		MMP-13	Colagenase-3
B	MMPs com domínio de hemopexina simples	MMP-18	Colagenase-4 (Xenopus; nenhum homólogo humano conhecido)
		MMP-19	-
		MMP-20	Enamelisina
		MMP-22	CMMP (<i>chicken</i> , nenhum homólogo humano conhecido)
		MMP-27	-
		*	Mcol-A (camundongo)
C	MMPs de ligação à gelatina	*	Mcol-B (camundongo)
		MMP-2	Gelatinase A
		MMP-9	Gelatinase B
		-	Gelatinase 75-kDa (galinha)
D	MMPs secretadas ativadas por furina	MMP-11	Estromelisina-3
		MMP-28	Epilisina
E	MMP com inserção semelhante à vitronectina	MMP-21	Homólogo de XMMP (Xenopus)
F	MMPs transmembranares	MMP-14	MT1-MMP
		MMP-15	MT2-MMP
		MMP-16	MT3-MMP
		MMP-24	MT5-MMP
G	MMPs ancoradas por GPI	MMP-17	MT4-MMP
		MMP-25	MT6-MMP
H	MMP transmembranar tipo II	MMP-23	CA-MMP (Arranjo de cisteína)

Fonte: Adaptado de Egeblad e Werb (2002).

A atividade proteolítica das MMPs também inclui moléculas não-MEC, variando de precursores de fatores de desenvolvimento a moléculas de adesão de superfície celular e precursores angiogênicos. Sabe-se que na invasão neoplásica, além da degradação da MEC e da membrana basal, as MMPs estão envolvidas no rompimento da adesão célula-célula devido à clivagem das E-caderinas (MMP-3 e MMP-7) e integrinas, facilitando a liberação de células neoplásicas isoladas e invasão dos vasos sanguíneos e linfáticos. Essas

proteases também foram implicadas na transição mesenquimal de células epiteliais, processo de perda de polaridade celular e adesão célula-célula, com ganho da capacidade de migração e propriedades invasivas, observado em metástases iniciais na progressão tumoral (ROY et al, 2009).

A progressão tumoral é caracterizada pelo aumento da secreção e ativação das MMPs, produzidas pelas próprias células do tumor ou estromais, tais como os fibroblastos e macrófagos (Figura 5) (STERNLICHT *et al*, 2000; STETLER-STEVERNSON, 2008).

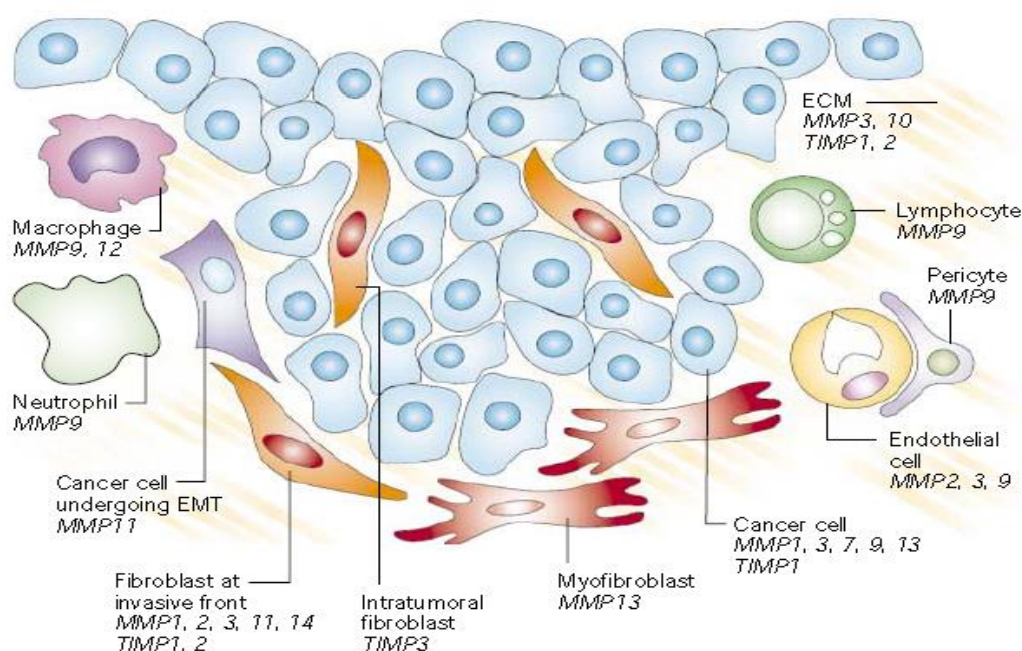


Figura 5. Expressão de metaloproteínases da matriz (MMPs) e seus inibidores tissulares (TIMPs) nas interações tumor-estroma. A progressão tumoral se dá através de uma comunicação recíproca entre as células tumorais e do estroma, que depende das vias de sinalização reguladas pelos diversos componentes da MEC, resultando, em última instância, no crescimento do tumor, sobrevivência celular e colonização de sítios metastáticos. Diferentes MMPs e TIMPs são sintetizados pelas células cancerígenas, células cancerígenas submetidas a transição epitélio-mesenquimal (TEM) e células estromais, incluindo fibroblastos, células endoteliais e inflamatórias, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos. O conjunto singular de MMPs e TIMPs expressos no estroma tumoral varia com o tipo e estágio do tumor.

Fonte: Adaptado de Egeblad e Werb (2002).

A infecção persistente pelo HPV de alto risco é uma condição necessária para o desenvolvimento de câncer de colo uterino, porém nem todas as mulheres infectadas desenvolverão lesões invasivas, havendo a necessidade de co-

fatores (ZUR HAUSEN, 2002). Poucos estudos avaliaram a interação entre a infecção pelo HPV e a expressão e atividade de diferentes MMPs e seus reguladores na carcinogênese cervical.

2.4.1 METALOPROTEINASE DE MATRIZ – 3 (MMP-3)

As MMP-3 são proteínas com um peso molecular estimado de 54 kDa e são expressas pelo gene da MMP-3 localizado no cromossomo 11q22.3 (NCBI GENE, 2015). Atuam degradando colágenos do tipo II, III, IV, IX e X, proteoglicanas, fibronectinas, lamininas e elastinas (YE et al 1996), ou seja, componetes que precisam ser rompidos para promover, além da digestão da MEC, a degradação de proteínas das junções célula-célula e célula-membrana (SCHROPFER et al, 2010). Está presente como proteína fundamental na remodelação do tecido conjuntivo, em processos de cicatrização de feridas, em casos de progressão de aterosclerose, e na iniciação tumoral (EGUCHI et al 2008). Quanto ao local de síntese, Egeblad e Werb, 2002, sugeriram que sua produção ocorra tanto em células do câncer, como em células endotéliais, ou até mesmo em células estromais, como nos fibroblastos.

A MMP-3 pertence à família mais importante de biomarcadores que definem um fenótipo maligno as células cancerígenas, visto que a sua produção está relacionada à quebra de proteínas da matriz extracelular conferindo a essas células uma maior possibilidade de invadir tecidos vizinhos ou outros tecidos a distância (metástase) (McCawley; Matrisian, 2000), sendo, dessa forma, de grande importância para a progressão tumoral (Tsukifuji, Tagawa,

HATAMUCHI e SHINKAI, 1999) e na modulação da transição epitélio-mesenquimal no microambiente tumoral (HAGEMANN, 2007).

Alguns estudos demonstraram a relação da MMP-3 com o desenvolvimento do câncer. Mendes et al, (2005), avaliaram a metástase cerebral do câncer de mama em ratos singênicos a partir da inoculação de células de adenocarcinoma mamário. Através de análises por RT-PCR e Zimografia, encontraram uma maior expressão e atividade da MMP-3 em cérebros com metástases do que em cérebros normais. Constatando que a MMP-3 desempenha um importante papel na progressão na metástase cerebral do câncer de mama.

O estudo realizado por Nagata et al, (2003), através da análise de cDNA microarray, buscaram identificar potenciais biomarcadores para a metástase ganglionar de carcinoma epidermóide da boca. Esta pesquisa mostrou que todos os tecidos de carcinoma epidermóide estudados com metástase ganglionar exibiram aumento dos níveis de expressão de MMP-3 em relação aos tecidos sem metástase ganglionar.

Argüello-Ramírez et al, (2004) relataram forte expressão de MMP-3 em lesões de alto grau de amostras cervicais, sendo principalmente elevada em casos de adenocarcinomas, enquanto que nas lesões de baixo grau (NIC I), essa expressão é baixa. De maneira interessante este estudo revelou também que as mulheres com expressão elevada de MMP-3 apresentam uma baixa resposta ao tratamento de radioterapia.

Rajkumar *at al.* (2011) realizaram um estudo com mulheres indianas onde se propôs a identificar genes que se expressam de forma diferente entre os tecidos de cérvix uterina normais, displásicos e com câncer cervical invasivo. Referente a análise da MMP-3 eles mostraram que houve uma sobre-expressão

em tecidos com câncer em relação aos tecidos de cérvix normais ou com variados graus de displasias.

Portanto, alguns trabalhos vêm demonstrando que a MMP-3 pode estar envolvida na progressão das lesões cervicais e do câncer. Desta forma, apresenta potencial para servir como biomarcador precoce na detecção de lesões intraepiteliais e carcinoma cervical, além de poder constituir também um importante alvo terapêutico.

2.5 INIBIDOR TISSULAR DE METALOPROTEINASE (TIMP)

As atividades das MMPs são especificamente inibidas pelos TIMPs (Inibidores Tissulares de Metaloproteinases), constituído por um grupo de quatro tipos: TIMP-1, -2, -3 e -4 (ROY et al, 2009). De forma geral os TIMPs são responsáveis por efeitos contrários à atividade proteolítica das MMPs, consequentemente contribuindo na inibição da progressão neoplásica, assim como o RECK (Reversion-inducing Cysteine-Rich Protein), que pode regular MMP-2, -9 e MT1-MMP, por exemplo.

Os inibidores das MMPs podem ser localizados no soro e nos tecidos tornando assim possível sua detecção, quantificação e monitoramento. Estudo com tumores de colo do útero identificou TIMP-2 em metade das células neoplásicas e estromais (VALDIVIA et al, 2011).

Além dos TIMP, estudos têm encontrado outras moléculas capazes de inibir a atividade das MMP, é o caso do RECK (Reversion-inducing-Cysteine-rich protein with Kazal motifs). As pesquisas, por exemplo em cânceres pancreático, mamário, pulmonar, prostático, colorretal e hepatocarcinoma mostram uma

relação de diminuição com a progressão da lesão (DONG et al,2010). Outras análises associam os aumentos da TIMP-2 e do RECK com a diminuição da invasividade, potencial metastático e melhor prognóstico.

Cardeal et al, (2012), analisaram o efeito das oncoproteínas do HPV-16 na expressão de MMP-2, MMP-9, MMP-14 e seus inibidores TIMP-2 e RECK em cultura de queratinócitos, e constataram que E7 estava associado com o aumento da atividade da pró-MMP-9, enquanto que as oncoproteínas E6 e E7 participavam da diminuição dos níveis de RECK e TIMP-2.

Dessa forma, o estudo dos inibidores tissulares das metaloproteinases, assim como suas moléculas alvo, apresentam grande potencial para uso como biomarcador visando a identificação do grau da progressão tumoral; prognóstico para invasão nos tecidos adjacentes e metástase.

2.6 ONCOPROTEÍNA E6

A E6 é uma oncoproteína superexpressa pelo HPV após a integração do genoma do HPV ao DNA da célula infectada. Dentre algumas das funções atribuídas a esta proteína está a sua interação, seguida pela degradação da proteína pró-apoptótica BAK e a ubiquitinação e degradação da proteína p53. Resultando na resistência da célula à apoptose e o aumento da instabilidade cromossômica por acúmulo de mutações no genoma da célula hospedeira (ZUR HAUSSEN, 2002).

A oncoproteína de alto risco E6 faz uso de vários mecanismos para interferir nas funções celulares (MOODY et al 2010). Ela recruta uma ubiquitina celular ligase associada à proteína (E6AP) que forma um complexo trimérico com

a p53 a qual leva a ubiquitinação e degradação da p53. Sem a proteína p53, a célula perde a capacidade de perceber e reparar possíveis danos no DNA (Figura 6). Assim, aumenta a frequência das mutações, e esse acúmulo é a causa subjacente ao desenvolvimento de neoplasias (MOODY et. al, 2010).

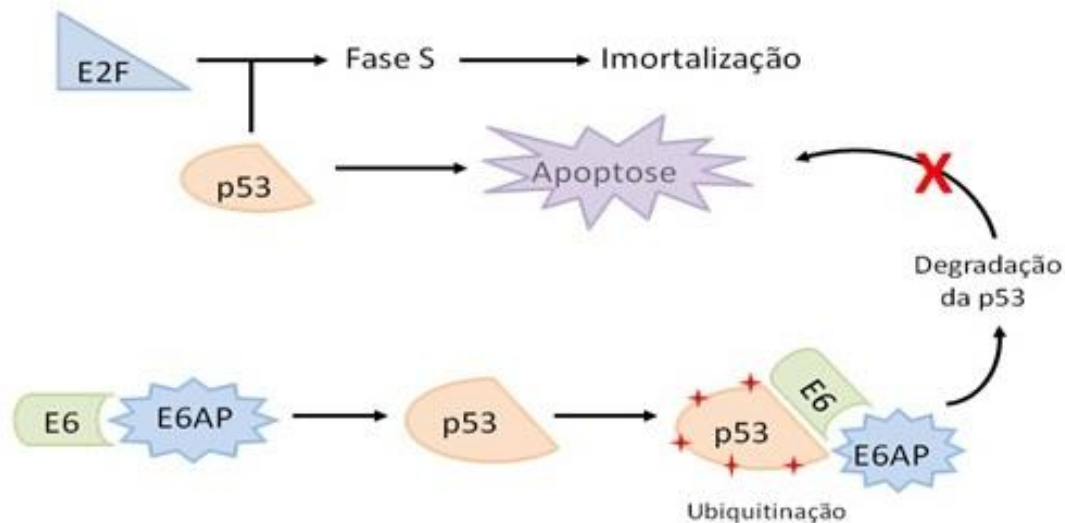


Figura 6. Mecanismo de ação da oncoproteína E6. Fonte autor.

Outra maneira da E6 de inativar a p53 é a sua ligação com a p300, bloqueia a acetilação e inibe a capacidade da transcrição do gene e sua expressão (PATEL et. al., 1999).

A E6 também induz a expressão da telomerase, responsável pela replicação das extremidades finais do DNA, os telômeros. E que são perdidos progressivamente com as replicações celulares e importantes na manutenção da integridade do genoma codificante. A proteína de alto risco E6 ativa a transcriptase reversa da telomerase (TERT) que age estimulando a ação da telomerase através da interação E6AP com moduladores, repressores, ativadores e fatores nucleares de transcrição que se ligam aos sítios promotores do TERT (MOODY et. al, 2010).

A E6 também promove a inativação de IRF3 (*interferon (IFN)-regulatory factor 3*) o que impossibilita a transcrição de interferons alfa e beta, bem como outros genes induzidos por interferon (ZUR HAUSEN, 2002).

2.7 A proteína p16^{INK4a}

A perda do controle normal do ciclo celular é essencial para que haja transformação neoplásica, o que pode ser resultado de alterações em pelo menos um dos quatro reguladores-chave do ciclo celular (p16^{INK4a}, p53, CDK4 e pRb).

A proteína p16^{INK4a}, inibidora de quinase 4, é uma reguladora da divisão celular, superexpressa pela presença da oncoproteína E7 do HPV. A inativação da pRb pela oncoproteína E7 do HPV estimula a liberação do fator de transcrição E2F induzindo a célula a sair da fase G1 e entrar na fase S do ciclo celular (Figura 7), causando a perda do feed-back negativo entre pRb e o gene CDKN2A, este segue com a produção e acúmulo da p16^{INK4a} no núcleo e citoplasma da célula (BERGERIN et al, 2010).

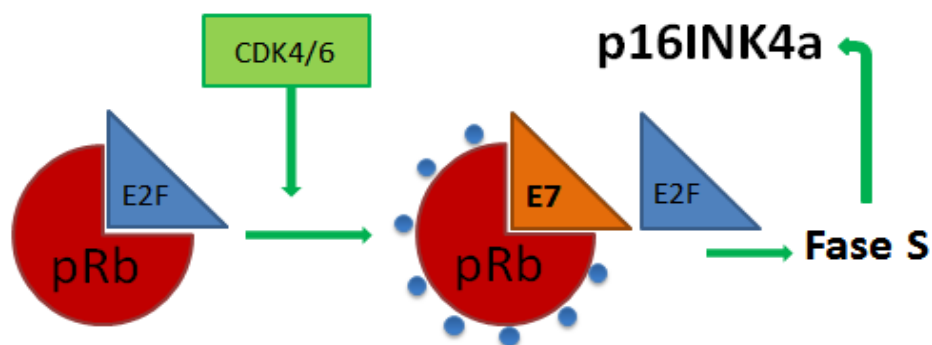


Figura 7. Mecanismo de ação da oncoproteína E7 causando aumento da expressão da proteína p16^{INK4a}. Fonte autor.

Estudos mostram que a superexpressão da proteína p16^{INK4a}, pode ser utilizada para estimar a evolução e extensão da lesão cervicais e auxiliar na diminuição das variações diagnósticas inter-observadores. Sua expressão é observada em núcleos e citoplasmas de células displásicas do epitélio escamoso, assim como em carcinomas (RAJCANI et al, 2009; MISSAOUI et al, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão imunohistoquímica da metaloproteinase de matriz 3 (MMP-3), do inibidor endógeno de metaloproteinase de matriz 2 (TIMP-2), p16^{INK4a} e da oncoproteína E6/HPV-16/18 em amostras de lesões e câncer cervical.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a amostra segundo os laudos citológicos, histológicos e tipagem do HPV;
- Investigar a associação entre a expressão imunohistoquímica das proteínas MMP-3, TIMP-2, p16^{INK4a} e E6 na amostra cervical com os dados citológicos e histológicos;
- Investigar se há relação entre os níveis das proteínas MMP-3, TIMP-2, p16^{INK4a} e E6 com o tipo do HPV;
- Correlacionar os níveis das proteínas MMP-3, TIMP-2, p16^{INK4a} e E6 com o grau de desenvolvimento das lesões.

4. METODOLOGIA

4.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo realizado através do método observacional, analítico transversal.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente trabalho foi apresentado sob o CAAE nº: 17068913.6.0000.5208 ao Comitê de Ética em Pesquisa/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Os pacientes e familiares que, após informação, concordaram em participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A).

As informações foram utilizadas única e exclusivamente para a execução do presente projeto e a identidade das participantes será mantida em sigilo absoluto.

4.3 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no setor de Colposcopia e Patologia Cervical do Serviço de Ginecologia do Hospital das Clínicas da UFPE (HC/UFPE) e no

Laboratório de Pesquisas Celulares e Moleculares do Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas (LPCM – LabCen/CCB).

O Setor de Colposcopia e Patologia Cervical, além de realizar exames de colposcopia e citologia das pacientes dos ambulatórios de Ginecologia, Pré-natal, Oncologia e de Doenças Infecciosas do hospital, tem como enfoque principal atender à demanda de pacientes que são referenciadas da rede de assistência básica e de outros serviços, cujo resultado do exame citológico de rastreio tenha mostrado atipia de células epiteliais.

Essas pacientes, agendadas como colposcopia-referência, são submetidas a uma nova coleta citológica convencional, colposcopia e biopsia dirigida das lesões encontradas, de conformidade com as Diretrizes Brasileiras para Rastreamento do Câncer do Colo do Útero de 2011. Após esses procedimentos, são agendadas para consulta de retorno, quando, dependendo do resultado dos exames citológico e histológico, será definida a conduta segundo protocolos preconizados pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA).

Havendo indicação de tratamento cirúrgico por alça diatérmica, com bisturi de alta frequência (CAF), esse procedimento é realizado no mesmo ambulatório. Os demais tratamentos, sejam cirúrgicos, quimioterápicos e ou radioterápicos, são oferecidos pelo próprio hospital. O perfil do HC/UFPE é, portanto, de Unidade de Assistência Secundária e Terciária dentro do organograma do SUS.

Também é assegurado às pacientes o seguimento pós-tratamento, dentro da periodicidade indicada, pelo tempo necessário a cada caso.

Exames citológicos e as análises biomoleculares foram realizados no Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares localizado no Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas (LPCM – LabCen/CCB), este realiza

trabalhos de pesquisas que envolvem como tema central o estudo do câncer e o envolvimento do Papilomavírus humano em seu desenvolvimento. Em um projeto de extensão realiza exames citológicos preventivos, conhecido como Exame de Papanicolauo, em mulheres residentes em comunidade carente que procuram o serviço de atendimento com o intuito de prevenção do câncer do colo do útero. As pacientes que apresentam alguma alteração citológica são encaminhadas para o serviço de Colposcopia e Patologia Cervical do Hospital das Clínicas onde seguem com o tratamento adequado de acordo com o seu grau de lesão.

Os exames histológicos, considerados padrão ouro para o diagnóstico, é realizado em todas as mulheres que passarem pelo setor de Colposcopia do Hospital das Clínicas e são realizados no Laboratório de Anatomia Patológica do próprio hospital.

4.4 POPULAÇÃO ALVO E PERÍODO

O estudo contou com a participação voluntária de 86 mulheres atendidas no Hospital das Clínicas/UFPE com idade maior de 18 anos apresentando exame citológico positivo para lesões intraepiteliais e invasivas, atendidas no Setor de Colposcopia do Hospital das Clínicas da UFPE e no Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares no período de agosto de 2014 a outubro de 2015.

4.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes com resultado de exame citológico apresentando lesões intraepiteliais e invasivas;
- Pacientes que aceitarem participar do projeto e assinarem o TCLE;
- Pacientes que aceitarem realizar o teste de HIV e apresentarem resultado negativo.

4.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes portadoras do vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV);
- Pacientes imunossuprimidas por outros fatores não relacionados ao HIV (doenças autoimune, transplantadas);
- Pacientes vacinadas para HPV (6, 11, 16, 18);

4.7 MÉTODO DE COLETAS

4.7.1 Serviço de Atendimento do Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares.

No primeiro atendimento foi realizado o cadastro das mulheres no banco de dados do laboratório, em seguida foi preenchida a ficha padronizada, onde foram anotados dados referentes a:

- Idade;
- Número de gestações;
- Número de partos;
- Menarca;
- Idade da coitarca (primeira relação sexual);

- Número de parceiros;
- Hábito de fumar;
- Uso de contraceptivo oral.

4.7.1.1 Coleta Citológica

Após o preenchimento do questionário a paciente seguia para a sala de coleta onde foi colhido material da ectocérvice com espátula e da endocérvice com escova ginecológica, que foram utilizados para a confecção de uma lâmina de esfregaço citológico convencional fixado com o CarbowaxTM. A mesma escova utilizada para a coleta citológica foi aproveitada para análises moleculares, para isso a mesma foi cortada próximo ao local das cerdas e mergulhada em solução tampão PBS, sendo utilizada posteriormente para o estudo do DNA.

Após a fixação do material em lâmina e obtenção da amostra para os estudos moleculares, todo o material foi devidamente identificado, acondicionado e enviado para o laboratório onde foi analisada e dado o laudo citológico da paciente. Quando se tinha um laudo negativo a paciente era liberada do serviço, sendo estimulada a realizar o exame periodicamente, caso contrário, quando o laudo foi positivo, ou seja, apresentou alguma atipia citológica, a paciente foi encaminhada para o Setor de Colposcopia do Hospital das Clínicas, onde seguiu com as diretrizes para o tratamento.

4.7.2. Serviço de Atendimento do Setor de Colposcopia do Hospital das Clínicas da UFPE.

Este serviço de atendimento recebe mulheres que já passaram por um exame citológico e que apresentaram algum tipo de atipia citológica, sendo, portanto, um serviço de atendimento referenciado que atende mulheres encaminhadas de outros serviços de triagem e também as mulheres encaminhadas pelo LPCM. Na primeira consulta das mulheres encaminhadas para esta unidade de atendimento foi tomada a história da paciente com a análise do exame citológico alterado que a paciente levou e que motivou a referência para o ambulatório de colposcopia, sendo também valorizada a existência de tratamento prévio de alterações no colo do útero. Em seguida foi preenchida a ficha padronizada do serviço, onde também foram anotados dados referentes a:

- Idade;
- Número de gestações;
- Número de partos;
- Menarca;
- Idade da coitarca (primeira relação sexual);
- Número de parceiros;
- Hábito de fumar;
- Uso de contraceptivo oral.

4.7.2.1. Coleta Citológica

Seguindo a rotina do serviço, após a anamnese foi realizado o exame ginecológico, iniciando com a inspeção da vulva seguida do exame especular.

Após o exame macroscópico, foi colhida uma nova amostra citológica da ectocérvice com espátula e da endocérvice com escova ginecológica para um esfregaço citológico convencional fixado em álcool absoluto, esta segunda coleta serviu para confirmação da alteração citológica previamente diagnosticada. Da mesma forma, a escova utilizada para a coleta citológica foi aproveitada para análises moleculares e para isso a mesma foi cortada próximo ao local das cerdas e mergulhada em solução tampão PBS que foi utilizada para estudo do DNA do HPV.

4.7.2.2. Coleta da Biopsia

A propedêutica prosseguiu com a colposcopia, usando o ácido acético a 3%, e o teste de Schiller. Identificadas as alterações colposcópicas, foi realizada a biopsia com pinça de Gaylor-Medina de 0,5 cm de diâmetro, tomando-se múltiplos fragmentos que foram fixados em formol a 10% tamponado para a avaliação anátomo-patológica. A hemostasia foi feita com gel de cloreto férrico a 48% e tamponamento vaginal, orientando a paciente a retirá-lo após 24 horas.

Terminado o exame foi feita a descrição dos procedimentos e o laudo colposcópico seguindo a Nomenclatura Internacional do Rio de Janeiro de 2011 de classificação colposcópica.

Na primeira fase do estudo, seguindo o padrão da Sociedade Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, o material coletado para citologia convencional e os fragmentos de biopsia foram encaminhados para o Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas - UFPE, acompanhados das respectivas

fichas de requisição do SISCOLO, padronizadas pelo Ministério da Saúde para a primeira avaliação.

A paciente foi agendada para um segundo atendimento quando, de posse dos resultados da nova citologia e do exame histopatológico, eram avaliadas as condutas a serem propostas. Nessa ocasião a paciente era esclarecida sobre sua doença, e sobre o tratamento ou o acompanhamento necessário, sendo então convidada a participar da pesquisa, da qual só faria parte se desse o consentimento, sendo-lhe reafirmado que caso essa não fosse de sua vontade, o tratamento não deixaria de ser realizado no próprio hospital. Antes de dar o pleno acordo, era perguntado se ela concordava em realizar o teste de HIV, o que já é solicitado rotineiramente no ambulatório de Patologia Cervical a todas pacientes que tem biopsias positivas para neoplasias intraepiteliais cervicais.

As pacientes que aceitaram participar do estudo tiveram o material da citologia convencional e a escova colocada em PBS, enviadas para o Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares, para confecção da lâmina de reserva da citologia convencional e revisão. Assim como, o material coletado em meio líquido (PBS) também foi utilizado para detecção do DNA de HPV pelo método de PCR utilizando os *primers* MY9/MY11. Nos casos positivos, foi realizada a genotipagem através do uso de primers específicos.

4.8 DETECÇÃO DO DNA-HPV

4.8.1 Extração de ácidos nucleicos

Os tubos contendo a amostra biológicas foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e ao sedimento celular foi adicionada a solução de extração (0.1M NaCl, 10mM EDTA, 10mM Tris pH 7.5, contendo 0.5% de SDS e 0.5g/l de proteinase K) e incubados a 56°C por 30min. O DNA foi purificado através do método padrão Fenol/Clorofórmio 1:1 seguido da precipitação por Isopropanol a -20°C por 20minutos. Após a precipitação o sobrenadante foi retirado por inversão e deixado em temperatura ambiente para secagem do precipitado. O DNA purificado foi diluído novamente em Tris para amplificação por PCR.

4.8.2 Detecção de DNA do HPV

Utilizando os iniciadores (primers) MY09/MY11 (Nobre et al 2008): 5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3' e 5'-CMCAGGGWCATAAYAATGG-3' foi amplificado por PCR o trecho hipervariável do gene L1 do HPV. A PCR foi realizada com 1.5mM MgCl₂, 12.5 pmol de cada primer, 200mM de cada dNTP e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As condições de termociclagem foram realizadas de acordo com Nobre et al, (2008), com uma desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos com posterior extensão final a 72°C por 8 minutos. Como controle da eficiência da extração do DNA e da reação de PCR foi amplificado um fragmento de 501 pares de bases do gene da β -Globina usando os primers Beta1/Beta2 (Nobre et al, 2008): 5'-TCAACCCTACAGTCACCCAT-3' e 5'-CTAACAATTACGAACAGCAATGAG-3' com as mesmas condições de PCR.

Todas as amostras foram amplificadas na presença de controles positivo (plasmídeo do HPV-16 clonado) e negativo (água milli-Q). Os produtos da PCR obtidos foram analisados em gel de agarose na concentração de 2% corados com brometo de etídio.

4.9 GENOTIPAGEM DO HPV POR PRIMERS ESPECÍFICOS

A tipificação do DNA do HPV foi realizada por amplificação de DNA através de reação de PCR convencional, utilizando oligonucleotídeos específicos para os HPVs 16, 18, 31, 33 e 58, que segundo estudos anteriores se mostraram os mais incidentes em Pernambuco. Foram escolhidos primers específico a fim de evitar sobreposições no sequenciamento, o que dificultaria ou impossibilitaria os estudos das infecções múltiplas. Estes oligonucleotídeos anelam-se na proteína L1, em um volume final de 25µl, contendo 12,5µl de Master Mix (GoTaq Green PCR Marter Mix, Promega), 1,5µl de cada *primer* (10 pM/µl), 5,5µl de água sem nuclease (Nuclease-Free Water, Promega) e 4µl de DNA (50 ng/µl) de cada amostra. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos à 57°C para HPV-16, 53°C para HPV-18, 55°C para HPV-31, 58°C para HPV-33 e 59°C para HPV-58, todos por 20 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C durante 5 minutos. Todas as amostras foram amplificadas na presença de controles positivo e negativo (água milli-Q). Os produtos da PCR obtidos foram analisados em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio.

4.10 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA MMP-3, TIMP-2, p16^{INK4a} e E6.

A imunohistoquímica para detecção das proteínas MMP-3, TIMP-2, p16^{INK4a} e E6 HPV-16/18 foi realizada em cortes de 4µm de espessura de blocos parafinados dos fragmentos de biopsias colhidas para análise histológica e contendo porções representativas da área de lesão utilizando o método livre de biotina, conjugado com HRP. Foram utilizados anticorpos monoclonais de rato contra a proteína MMP-3 (Santa Cruz Biotechnology, code: sc-21732; diluição 1:400), TIMP-2 (Santa Cruz Biotechnology, code: sc-21735; diluição 1:300), p16^{INK4a} (Santa Cruz Biotechnology, code: G-175-405; diluição 1:400) e E6 HPV-16/18 (Santa Cruz Biotechnology, code: sc-460; diluição 1:200). A recuperação antigênica foi realizada utilizando panela de pressão por um tempo de dois minutos. As lâminas foram resfriadas até chegar a temperatura ambiente e a peroxidase endógena foi posteriormente bloqueada utilizando BSA (Bovine Serum Albumin) por um período de uma hora, depois as lâminas foram incubadas overnight com os anticorpos primários, seguido do sistema de visualização HRP. As lâminas seguiram para incubação com solução cromógena de diaminobenzidina (DAB), lavadas com água, contra-coradas com hematoxilina, desidratadas e montadas com lamínula e Entellan® (Merk).

Foi utilizado o microscópio com câmera Zeiss e o programa AxioVision para fotografar áreas que apresentaram reação positiva para a imunohistoquímica.

A análise da imunoreatividade foi realizada através do software ImageJ (Figura 8) com o auxílio do plugin IHC Tool Box (Figura 9), este plugin seleciona a área marcada pelo DAB e o software produz um histograma (Figura 10) que

mostra a intensidade dos pixels da área previamente selecionada pelo plugin. A partir do histograma foi quantificada a intensidade da imunoreatividade.

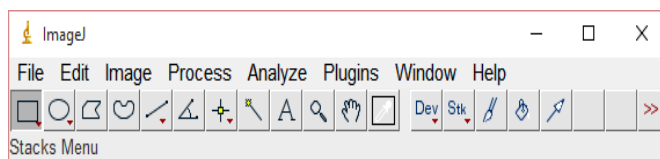


Figura 8. Software ImageJ. Fonte: Software Image J.

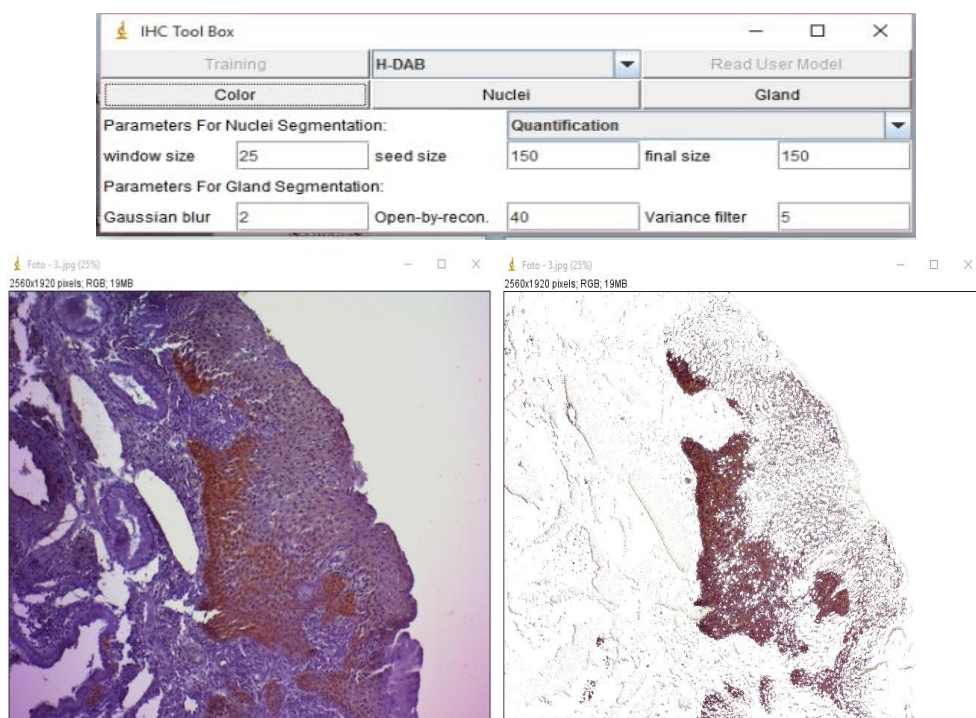


Figura 9. Plugin IHC Tool Box selecionado a opção H-DAB e imagens mostrando a seleção da área de imunoreatividade selecionada pelo plugin. Fonte: Plugin IHC Tool Box.

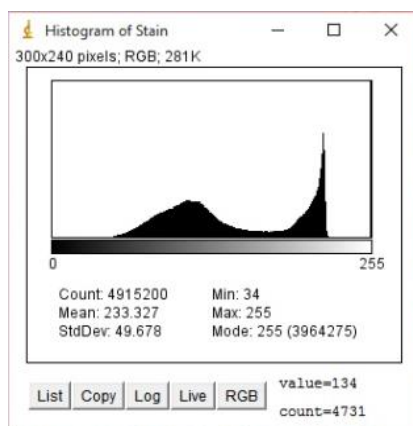


Figura 10. Histograma. Fonte: Software Image J.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do software Prisma 5.0 para Windows. Para avaliar a distribuição dos dados foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. O teste ANOVA foi realizado para analisar a associação entre os grupos de variáveis qualitativas ordinais: intensidades da expressão imunohistoquímica e graus histopatológicos de lesões cervicais. Para avaliar a concordância entre o exame citológico e histológico foi realizado o Teste de Kappa. A significância estatística foi definida em $p < 0,05$.

5. ARTIGO ORIGINAL

AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA ONCOPROTEÍNA E6, P16^{INK4a}, MMP-3 E TIMP-2 NAS LESÕES PRECURSORAS E CÂNCER CERVICAL DE MULHERES INFECTADAS PELO HPV DE ALTO RISCO ONCOGENICO

Giwellington Silva Albuquerque¹, Mariléa de Lima Guimarães², Dafne Carolina Alves Quixabeira¹, Jonathan Wagner de Medeiros³, Silvania Tavares Paz⁴, Mirella Cristina Pereira de Lima¹, Lianne D'Oleron Lima Vasconcelos⁵, Antonio Carlos de Freitas⁶ e Jacinto da Costa Silva Neto⁷.

- 1 - Biomédico, Mestre em Patologia – Universidade Federal de Pernambuco
- 2 - Médica Colposcopista – Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco
- 3 - Biomédico, Mestrando em Biologia Celular e Molecular - Universidade de Pernambuco
- 4 - Bióloga, Mestranda em Patologia - Universidade Federal de Pernambuco
- 5 - Odontóloga, Mestre em Patologia – Universidade Federal de Pernambuco
- 6 - Biólogo, Professor Adjunto da Universidade Federal de Pernambuco
- 7 - Biomédico, Professor Adjunto da Universidade Federal de Pernambuco

Resumo

O Câncer de colo uterino é o quarto mais comum em mulheres no mundo. Sabe-se que a carcinogênese cervical precede da infecção e persistência do Papilomavírus humano (HPV), o qual tem a capacidade de se integrar ao genoma do hospedeiro introduzindo os genes E6 e E7. O produto desses genes, as oncoproteínas E6 e E7 perturbam o ciclo celular promovendo superexpressão da proteína p16^{INK4a} e as metaloproteinases de matriz (MMP), que são moléculas capazes de promover a progressão das lesões cervicais uterinas. Nesse intuito, o presente estudo avaliou a expressão da oncoproteína E6, p16^{INK4a}, metaloproteinase de matriz 3 (MMP-3) e inibidor tissular de metaloproteinase 2 (TIMP-2) nos diferentes graus de lesões e câncer cervical, associando com a presença do HPV e seus genótipos. Foram utilizadas 86 amostras de escovado cervical e de fragmentos de biopsias de mulheres que foram diagnosticadas citologicamente com lesões cervicais intraepiteliais e invasivas. Todas as amostras foram genotipadas e submetidas a técnica de imunohistoquímica para a identificação da oncoproteína E6-HPV16/18, p16^{INK4a}, MMP-3 e TIMP-2. O perfil genotípico identificou o HPV16 (44,4%) como o mais prevalente, seguido por HPV31 (30,3%), HPV58 (15,1%), HPV18 (6,1%) e HPV33 (4,1%). A reação imunohistoquímica para E6 se mostrou mais intensa nos casos de invasão,

assim como p16^{INK4a}. Entretanto MMP-3 e o TIMP-2 se mostraram mais reativos em lesões pré-malignas. Portanto, este estudo mostra maior prevalência do HPV-16 em mulheres atendidas no Hospital das Clínicas – UFPE e sugere que a oncoproteína E6 e a proteína p16INK4a são biomarcadores úteis para aumentar a precisão do diagnóstico precoce de câncer de colo do útero. Contudo, em lesões pré-malignas os biomarcadores clinicamente úteis seriam MMP-3 e TIMP-2.

Palavras-chave: Câncer de colo do útero. Imuno-histoquímica. Diagnóstico

Abstract

Cervical cancer is the fourth most common in women worldwide. Cervical carcinogenesis is known to precede the infection and persistence of human papillomavirus (HPV), which has the ability to integrate into the host genome by introducing the E6 and E7 genes. The product of these genes, E6 and E7 oncoproteins disrupt the cell cycle promoting overexpression of p16INK4a protein and matrix metalloproteinases, molecules which are able to promote the progression of cervical uterine injury. To that end, the present study aimed to evaluate the expression of the oncoprotein E6, p16INK4a, matrix metalloproteinase 3 and the tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in varying degrees of injuries and cervical cancer, associated with the presence of HPV and its genotypes. 86 cervical brush samples were used and biopsies fragments of women who were diagnosed cytologically with intraepithelial cervical lesions and invasive. All samples were genotyped and subjected to immunohistochemistry to identify the oncoprotein E6, HPV16 / 18, p16INK4a, MMP-3 and TIMP-2. The genotype profile identified HPV16 (44.4%) was the most prevalent, followed by HPV31 (30.3%), HPV58 (15.1%), HPV18 (6.1%) and HPV33 (4.1%). The immunohistochemical reaction for E6 was more reactive in the case of invasion, as well as p16INK4a. However MMP-3 and TIMP-2 were more reactive in premalignant lesions. Therefore, this study showed a higher prevalence of HPV-16 in women treated at the Hospital - UFPE and suggests that the E6 oncoprotein and p16INK4a protein biomarkers are useful to improve the accuracy of early

diagnosis of cervical cancer. However, in premalignant lesions would be clinically useful biomarkers MMP-3 and TIMP-2.

Keywords: Uterine Cervical Neoplasms. Immunohistochemistry. Diagnosis

Introdução

O Câncer de colo uterino é o quarto mais frequente em mulheres no mundo (GLOBOCAN, 2012). Sabe-se que a carcinogênese cervical precede da infecção e persistência pelo Papilomavírus humano (HPV), vírus que tem a capacidade de se integrar ao genoma do hospedeiro e introduzir genes que superexpressam oncoproteínas, conhecidos como E6 e E7, que alteram o ciclo celular promovendo a ineficiência das proteínas p53 e pRb (ZUR HAUSEN, 2002; PITTAYAKHAJONWU; ANGELETTI, 2010), com consequente superexpressão de outras proteínas como a p16^{INK4a} que induz a célula a divisão celular (GUSTINUCCI et al, 2012). Entretanto o processo de progressão das lesões podem levar algum tempo, passando de alterações iniciais, intraepiteliais de baixo e alto grau (ZIELINSKI et al, 2001; WINER et al, 2005).

Estudos descrevem que as oncoproteínas virais do HPV de alto risco podem estar envolvidas com a carcinogênese cervical por induzir a superexpressão das metaloproteinases de matriz, um grupo de endopeptidases capazes de digerir matriz extracelular e membrana basal (MUHLEN et al, 2010). Zhu et al, 2015, relataram que ao inibir as oncoproteínas HPV16-E6/E7 em cultura de células de câncer cervical, houve uma diminuição na síntese da MT1-MMP, MMP-2 e MMP-9, fato este que provocou a inibição da migração celular. Mostrando que a expressão das oncoproteínas contribuem para a progressão das lesões cervicais.

Kaewprag et al, (2013), ao analisarem a influência da oncoproteínas HPV16-E6/E7 e HPV18-E6/E7 sobre as MMPs-1, -2, -7, -9, -10, -11 e MT1-MMP) em culturas de células de câncer cervical, encontram uma superexpressão das MMPs-2, -7 e MT1-MMP quando relacionadas com as proteínas HPV18-E6/E7 e apenas nas MMPs-2 e MT1-MMP e não MMP-7, quando relacionadas com HPV16E6/E7, mostrando que o tipo viral irá influencia no perfil de expressão das metaloproteinases.

Apesar de se conhecer bem algumas metaloproteinases de matriz, o papel da MMP-3 ainda não está bem esclarecido. Arguello-Ramírez et al, (2004), afirmaram, através de análises de células cultivadas de carcinoma escamoso, que a MMP-3 varia sua expressão diretamente conforme o aumento do grau de lesão e que pacientes com altos níveis de expressão não respondem adequadamente a quimioterapia. Rajkumar et al, (2011), através da técnica de microarray em biopsias cervicais, mostrou haver uma superexpressão da MMP-3 em tecidos com câncer em relação aos tecidos de cérvix normais ou com variados graus de displasias.

Sato et al, (2009), também utilizando cultura de células de carcinoma cervical e fibroblastos humanos, demonstraram um novo mecanismo de malignidade, onde em células de carcinomas cervicais verifica-se o aumento da expressão de MMP extracelular, incluindo MMP-3, que são expressas também pelas células estromais, isto ocorre a partir da interação dessas células com os indutores de metaloproteinases de matriz extracelular (EMMPRIN) que são encontrados altamente expressos na superfície celular de vários tumores e estimulam fibroblastos peritumorais a produzir MMPs.

As atividades das MMPs são especificamente inibidas pelos TIMPs -1, -2, -3 e -4 (Inibidores Tissulares de Metaloproteinases) e pelo RECK (Reversion-inducing Cysteine-Rich Protein), que são responsáveis por efeitos contrários à atividade proteolítica das MMPs, consequentemente contribuindo na inibição da progressão neoplásica (ROY et al, 2009).

Os inibidores tissulares das MMPs (TIMPs) podem ser localizados nos tecidos e no soro, tornando assim possível sua detecção, quantificação e monitoramento. A baixa expressão de TIMP-2 é uma das principais contribuições para o potencial invasivo do carcinoma cervical (TIMOSHENKO et al, 2014). Estudo com tumores de colo do útero identificou TIMP-2 em metade das células neoplásicas e estromais (VALDIVIA et al, 2011). Braicu et al, (2014), através da dosagem de TIMP-2 em amostras de soro, constataram que a diminuição dos níveis dessa proteína está significativamente associada ao risco de reincidência do câncer cervical.

No estudo realizado por Wu et al, (2011), com amostras de tecidos de câncer cervical e áreas de tecidos morfológicamente normais da mesma paciente, foi medido os níveis semiquantitativos de RNAm para TIMP-2,

constatando-se que todos os tecidos de câncer apresentavam um valor menor de TIMP-2 quando comparados com seus equivalentes normais, mostrando que esta molécula está envolvida na carcinogênese cervical.

Cardeal et al, (2012), analisaram o efeito das oncoproteínas do HPV16-E6/E7 na expressão de MMP-2, MMP-9, MMP-14 e seus inibidores TIMP-2 e RECK em cultura de queratinócitos, e constataram que as oncoproteínas E6 e E7 participam da diminuição dos níveis de RECK e TIMP-2.

Tendo em vista a importância de um rastreamento eficiente para a detecção precoce, melhor diagnóstico e melhor tratamento para o câncer cervical, uma vez que os procedimentos diagnósticos básicos em rastreio de câncer cervical não fornecem qualquer informação sobre a natureza biológica e comportamento das lesões, o presente estudo analisou a presença e superexpressão da proteínas metaloproteinases da matriz três (MMP-3), o inibidor tissular de metaloproteinases dois (TIMP-2), a proteína de ciclo celular p16^{INK4a} e a oncoproteína E6 do HPV em amostras cervicais de mulheres que apresentam desde alterações citológicas mínimas até a invasão, a fim de estabelecer um perfil biomarcador imunohistoquímico que contribua com um melhor diagnóstico das lesões cervicais.

Material e Métodos

Trata-se de um estudo realizado através do método observacional, analítico transversal que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) sob o CAAE de número 17068913.6.0000.5208.

O estudo contou com a participação voluntária de 86 mulheres com idade maior de 18 anos que foram referenciadas para o atendimento no Setor de Colposcopia do Hospital das Clínicas da UFPE, no período de agosto de 2014 a outubro de 2015 por apresentarem um exame citológico positivo para lesões intraepiteliais ou invasivas e que aceitaram participar da pesquisa assinando um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

A coleta das amostras foi realizada com o auxílio de escova ginecológica que posteriormente foi cortada próximo ao local das cerdas e mergulhada em solução tampão PBS para preservar o DNA. Após a coleta citológica foi realizada

a coleta de fragmentos de biopsias, com auxílio de uma pinça de Gaylor-Medina de 0,5 cm de diâmetro, os fragmentos obtidos dessa coleta foram fixados em formalina a 10% tamponada e encaminhados ao setor de anatomia patologia do próprio hospital os quais foram processados e analisados para definição do diagnóstico histológico. Os blocos resultantes das biopsias foram resgatados após o diagnóstico e feitos novos cortes para a realização da técnica de imunohistoquímica. O resultado dos exames citológico e histopatológico foi resgatado no setor de anatomia patológica do hospital das clínicas - UFPE.

Detecção e tipagem do HPV

A escova de coleta mergulhada em solução tampão PBS foi utilizada para detecção do DNA do HPV, para isso, foi realizada a extração do DNA e realizada a técnica da Polimerase Chain Reaction (PCR) convencional, através da amplificação do gene codificador da proteína L1, utilizando os primers consenso e degenerados MY09/MY11 para os diferentes tipos de HPV na região do gene viral L1 (Nobre et al, 2008). Todas as amostras foram amplificadas na presença de controle positivo (plasmídeo do HPV-16 clonado) e negativo (água milli-Q). Os produtos da PCR obtidos foram analisados em gel de agarose na concentração de 2% corados com brometo de etídio. A tipificação do DNA do HPV foi realizada por amplificação de DNA através de reação de PCR convencional, utilizando oligonucleotídeos específicos para os HPV 16 (769 pb), 18 (732 pb), 31 (728 pb), 33 (747 pb) e 58 (733 pb), os quais anelam no oncogene E6, em um volume final de 25µl, contendo 12.5µl de Master Mix (GoTaq Green PCR Marter Mix, Promega), 1.5µl de cada primer (10 pM/µl), 5.5µl de água sem nuclease (Nuclease-Free Water, Promega) e 4µl de DNA (50 ng/µl) de cada amostra. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 10 segundos, 57°C para HPV-16, 53°C para HPV- 18 55°C para HPV-31, 58°C para HPV-33 e 59°C para HPV-58, todos por 20 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C durante 5 minutos. Todas as amostras foram amplificadas na presença de controles positivo e negativo (água milli-Q). Os produtos da PCR obtidos foram analisados em gel de agarose 1.5% corados com brometo de etídio.

Imunohistoquímica

A Imunohistoquímica para as proteínas MMP-3, TIMP-2, p16^{INK4a} e Oncoproteína E6 foi realizada em cortes de 4µm de espessura de blocos parafinados de amostras colhidas para biopsia contendo porções representativas da área da lesão utilizando o método livre de biotina, conjugado com HRP. Os anticorpos utilizados foram monoclonais de rato contra a proteína MMP-3 (Santa Cruz Biotechnology, code: sc-21732; diluição 1:400), TIMP-2 (Santa Cruz Biotechnology, code: sc-21735; diluição 1:300), p16^{INK4a} (Santa Cruz Biotechnology, code: G-175-405; diluição 1:400) e E6 HPV-16/18 (Santa Cruz Biotechnology, code: sc-460; diluição 1:200). A recuperação antigênica foi realizada utilizando panela de pressão por um tempo de dois minutos. As lâminas sofreram resfriamento a temperatura ambiente e a peroxidase endógena foi bloqueada utilizando BSA (Bovine serum albumin) por um período de uma hora. As lâminas foram incubadas overnight com os anticorpos primários e em seguida foi utilizado o sistema de visualização HRP. As lâminas foram incubadas com solução cromógena de diaminobenzidina (DAB), lavadas com água, contra-coradas com hematoxilina, desidratadas e montadas.

Foi utilizado o microscópio com câmera Zeiss e o programa AxioVision para fotografar áreas que apresentaram reação positiva para a imunohistoquímica. A análise da imunoreatividade foi realizada através de histogramas de análises de pixels criados pelo software ImageJ das áreas previamente selecionadas com o auxílio do plugin IHC Tool Box.

Resultados

Citopatologia e histopatologia

Todas as pacientes que cederam amostra para o desenvolvimento da pesquisa foram referenciadas para o atendimento no setor de Colposcopia do Hospital das Clínicas UFPE por apresentarem resultados positivos para lesões intraepiteliais ou invasão através do exame citopatológico realizados em outros locais de atendimento básico (Citologia externa).

Como rotina do serviço especializado em ginecologia e colposcopia do Hospital das Clínicas, as pacientes são submetidas a uma nova coleta citológica e análise pela colposcopia. Para o estudo foram consideradas as pacientes que apresentavam alterações colposcópicas na cérvix uterina.

Das 86 amostras obtidas, a primeira citologia (citologia externa) foi realizada em 80 delas, visto que 6, já apresentavam o colo do útero com característica marcantes de lesão pelo laudo colposcópico, sendo então já referenciadas sem a necessidade do exame citológico. Das 80 amostras restantes 11 apresentaram lesão de significado indeterminado (ASC-US ou ASC-H), 30 mostraram-se com lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), 32 com lesão intraepitelial de alto grau (HSIL), 5 com lesões características de câncer e 2 com citologia negativa, que por apresentarem alteração colposcópicas foram encaminhadas para o serviço de referência. Os resultados do primeiro exame citológico podem ser vistos na tabela 1.

O resultado do segundo exame citológico, exame confirmatório colhido no próprio setor de colposcopia e realizado no laboratório de citopatologia do próprio hospital das clínicas - UFPE, diferiu em alguns resultados da primeira citologia, onde teve-se: 18 resultados como citologia negativa, 11 casos com lesões de significado indeterminado, 12 casos de lesão intraepitelial de baixo grau, 34 casos com lesão intraepitelial de alto grau e 11 amostras consideradas com lesões compatíveis com câncer, como pode ser visto na tabela 1.

Os resultados utilizados para o desenvolvimento dessa pesquisa levou em consideração os exames realizados no próprio hospital, ou seja, o segundo exame citológico. A relação entre o primeiro e o segundo exame citológico pode ser vista na tabela 1.

Tabela 1 – Resultados e Relação entre o primeiro e o segundo exame citológico

Citologia	1º Citologia		2º Citologia	
	n	%	n	%
Negativa	2	2,50	18	20,93
ASC-US / ASC-H	11	13,75	11	12,79
LSIL	30	37,50	12	13,95
HSIL	32	40,00	34	39,53
Câncer	5	6,25	11	12,79
Total	80	100,00	86	100,00

Todas as 86 mulheres passaram pela coleta de biopsias para confirmar os achados citológicos e/ou colposcópicos. Os exames histológicos mostraram os seguintes resultados: 17 casos (19,77%) sem NIC, 26 (30,23%) com NIC 1, 10 (11,63%) com NIC 2, 20 (23,26%) com NIC 3 e 13 (15,12%) com câncer.

Conforme o sistema de classificação Bethesda, no exame histopatológico a NIC 1 equivale a LSIL da citologia, e as alterações NIC 2 e 3 equivalem a HSIL. Porém as lesões indeterminadas na citologia não apresentam um equivalente direto no exame histológico. Do total das amostras tivemos 9 classificadas na citologia como ASC-US, sendo no resultado histopatológico esses nove diagnosticados como: 2 negativos para lesão, 5 como NIC 1, 1 como NIC 2 e 1 como carcinoma; já para os casos de ASC-H foram identificados 2 na citologia sendo no histopatológico os dois diagnosticados como NIC 3.

Analisando a relação entre os diagnósticos do exame citológico e o exame histopatológico, observamos uma considerável discordância entre os resultados, sendo no total 34 dos 86 casos (39,5%), o que está sendo mostrado na tabela 2. Para avaliar estatisticamente o grau de concordância entre os dois exames diagnósticos aplicamos o Teste de Kappa, que mostrou um valor de 0,574, sendo considerado a partir desse resultado como tendo um nível de concordância moderada (LANDIS, KOCH; 1977).

Tabela 2 – Discordância entre os exames Citopatológico e o Histopatológico.

Citologia	Histologia	n	%
Negativo	LSIL	10	29,41
ASC-US	Negativo	2	5,88
ASC-US	LSIL	5	14,71
ASC-US	HSIL	1	2,94
ASC-US	Câncer	1	2,94
ASC-H	HSIL	2	5,88
LSIL	Negativo	2	5,88
LSIL	HSIL	1	2,94
HSIL	Negativo	5	14,71
HSIL	LSIL	2	5,88
HSIL	Câncer	2	5,88
Câncer	HSIL	1	2,94
Total		34	100,00

Detecção e Genotipagem para HPV

Referente ao estudo de detecção de DNA-HPV pela PCR utilizando primers consenso MY09 e MY11, as 86 amostras analisadas foram positivas, porém, em 6 dessas amostras não foi possível determinar o tipo do HPV pela quantidade de DNA ser insuficiente.

A genotipagem com primers específicos encontrou positividade para 62 (77,5%) casos - figura 1. Entretanto, 18 (22,5%) casos, apesar de serem DNA-HPV positivo, foram negativos para os primers específicos, demonstrando possível infecção por outros tipos de HPV em estudo.

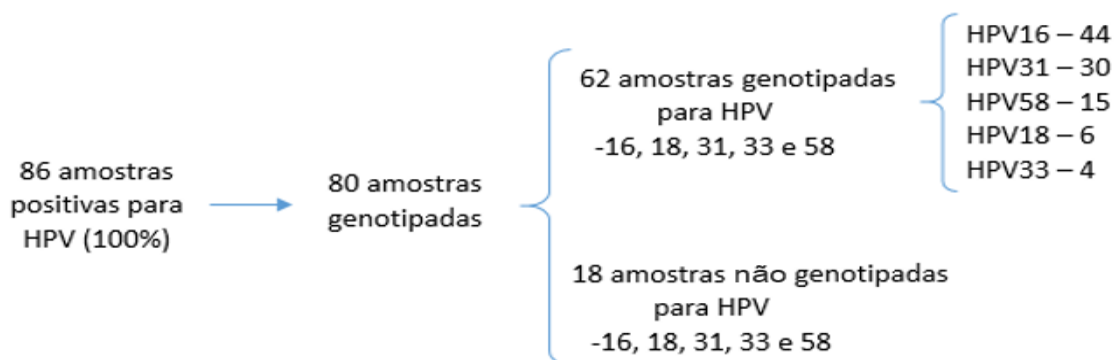


Figura 1 – Perfil genotípico do HPV

Esses dados mostram que nas 62 amostras genotipadas, foram encontrados 99 HPVs, o que revela a presença de co-infecções. Entre os perfis detectados, 30 (48,4%) apresentaram infecção única e 32 (51,6%) foi visto um perfil de infecção múltipla. Os perfis de infecção podem ser analisados na tabela 3 juntamente com os graus de lesão a partir do diagnóstico histopatológico.

Tabela 3 – Relação genotipagem com o diagnóstico histológico.

Tipos de HPV	Diagnóstico Histológico				
	NIC 1 (26)	NIC 2 (10)	NIC 3 (20)	Carcinoma (13)	Sem NIC (17)
HPV-16	6	-	5	4	4
HPV-18	-	-	-	-	-
HPV-31	4	-	-	-	1
HPV-33	-	2	-	-	-
HPV-58	1	1	1	-	1
HPV-16 + 18	-	-	1	-	-
HPV-16 + 31	6	1	3	4	1
HPV-16 + 58	1	1	2	-	-
HPV-31 + 18	1	-	-	1	-
HPV-31 + 58	2	-	1	-	-
HPV-33 + 18	-	-	1	-	-
HPV-58 + 33	-	-	1	-	-
HPV-16 + 18 + 31	-	1	1	-	-
HPV-16 + 31 + 58	1	-	1	-	1
HPV Inderminado	1	2	2	4	9

Imunohistoquímica pra MMP-3, TIMP-2, p16^{INK4a} e E6 HPV-16/18

A Imunohistoquímica para as proteínas MMP-3, TIMP-2, p16^{INK4a} e Oncoproteína E6 foi realizada nas amostras dos fragmentos de biopsias, representados na figura 2.

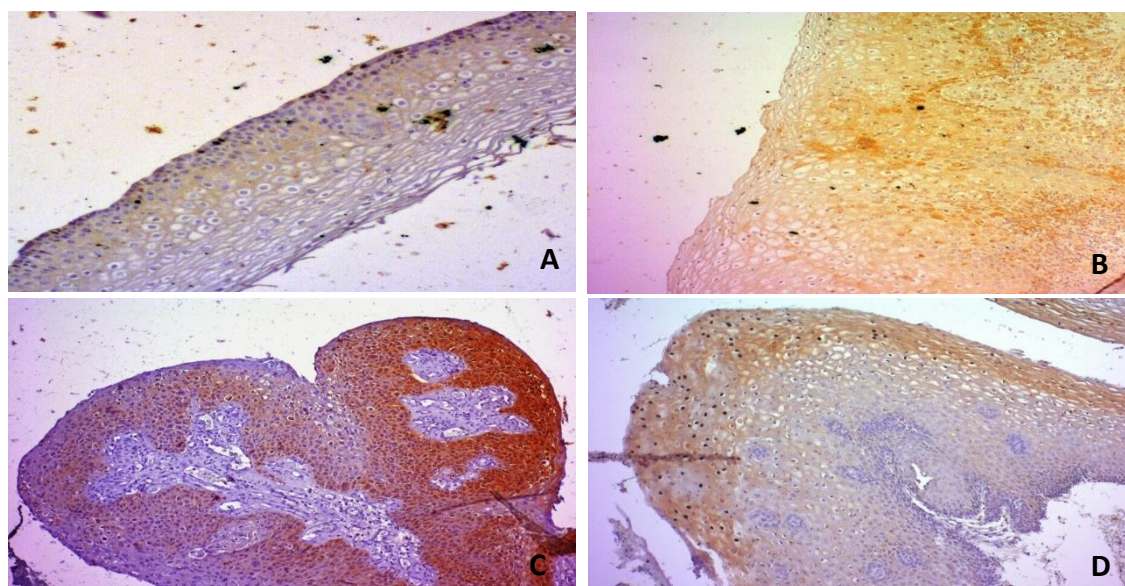


Figura 2. Imunohistoquímica representativa para as proteínas MMP-3 (A), TIMP-2 (B), p16^{INK4a} (C) e E6 HPV-16/18 (D).

A avaliação imunohistoquímica foi realizada a partir da média de pixels dada pelos histogramas de cada amostra analisada, sendo elas agrupadas pelo grau da lesão e relacionadas ao exame citológico (tabela 4), histopatológico (tabela 5) e com os tipos de HPV (tabela 6), o ponto de corte estabelecido para considerar uma amostra positiva para cada marcador foi a média obtida a partir dos casos negativos para lesão, ou seja, sem NIC.

A análise do histograma, por utilizar o sistema de cores RGB, nos fornece o número médio dos pixels da imagem através de sua escala, que vai do 0 ao 255, sendo o valor 0 representando a imagem preta, e o valor 255 a imagem branca. Dessa forma, ao utilizar essa escala para se medir a intensidade de uma reação imunohistoquímica, quanto menor o número médio do histograma maior será a reatividade, visto que quanto mais perto do valor 0 mais escura é a imagem, sendo maior a área marcada pelo marrom.

A análise estatística foi realizada através do teste de normalidade Shapiro-Wilk, o Teste t Student, que foi utilizado para avaliar a associação entre o TIMP-2, MMP-3, p16^{INK4a} e E6 e o grupo com diagnóstico negativo e positivo para lesão (tabela 4), e o teste de associação ANOVA que foi utilizado na avaliação da associação entre o TIMP-2, MMP-3, p16^{INK4a} e E6 com o diagnóstico citológico (tabela 5), histológico (tabela 6) e o tipo de HPV (tabela 7).

Tabela 4 – Relação Imunohistoquímica X Positividade para Lesão

	TIMP-2	MMP-3	p16	E6
Histologia	(p=0,26)	(p=0,45)	(p=0,38)	(p=0,58)
Negativo	202.994	212.586	236.048	229.999
Positivo	195.635	216.980	239.988	229.659

Tabela 5 – Relação Imunohistoquímica X Citologia

	TIMP-2	MMP-3	p16	E6
Citologia	(p=0,96)	(p=0,46)	(p=0,60)	(p=0,41)
Sem Lesão	195.974	220.017	238.957	229.169
LSIL	198.526	220.758	232.168	221.169
HSIL	198.588	210.032	239.896	234.949
Carcinoma	197.926	221.732	238.172	224.631
Lesão Indeterminada	194.207	215.084	243.357	229.519

Tabela 6 – Relação Imunohistoquímica X Histologia

	TIMP-2	MMP-3	p16	
Histologia	(p=0,77)	(p=0,24)	(p=0,20)	E6 (p=0,78)
Sem NIC	202.994	212.586	236.048	229.999
NIC 1	192.743	221.975	242.208	228.275
NIC 2	198.446	206.652	246.751	237.135
NIC 3	197.329	212.663	236.887	230.920
Carcinoma	196.293	222.997	236.446	224.919

Tabela 7 – Relação Imunohistoquímica X Tipo de HPV

	TIMP-2	MMP-3	p16	E6
Tipo de HPV	(p=0,87)	(p=0,47)	(p=0,77)	(p=0,83)
HPV-16	195.990	217.623	237.414	227.269
HPV-18	197.642	207.301	244.854	227.978
HPV-31	196.013	219.058	227.727	227.047
HPV-58	191.793	214.558	237.034	231.606
HPV-33	189.387	234.805	239.377	244.695
HPV Indeterminado	205.101	214.453	240.157	228.668

Imunohistoquímica para E6 HPV-16/18

A partir das médias expressas pelo histograma foi visto que para a Oncoproteína E6 HPV16/18 a marcação mais forte foi para os casos de câncer, seguidos pelo NIC1, NIC3 e NIC2 (Figura 3). Porém não apresentou valor estatisticamente significativo para essa associação, sendo o valor de p igual a 0,78.

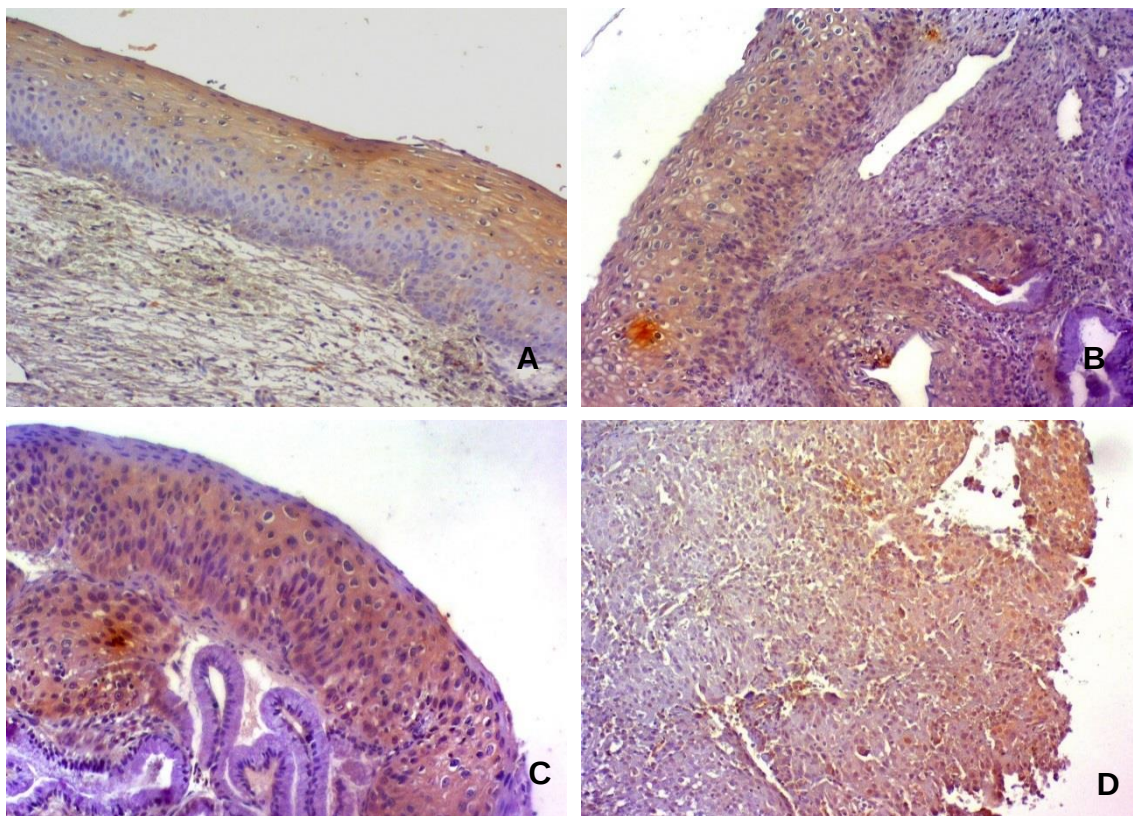


Figura 3. Imunohistoquímica para a oncoproteína E6 HPV-16-18 em NIC1 (A), NIC2 (B), NIC3 (C) e Câncer (D).

Imunohistoquímica para proteína p16^{INK4a}

A partir das médias expressas pelo histograma foi visto que para a proteína p16^{INK4a} a marcação mais forte foi para os casos de câncer, seguidos pelo NIC3, NIC1 e NIC2 (Figura 4). Porém não apresentou valor estatisticamente significativo para essa associação, sendo o valor de p igual a 0,20.

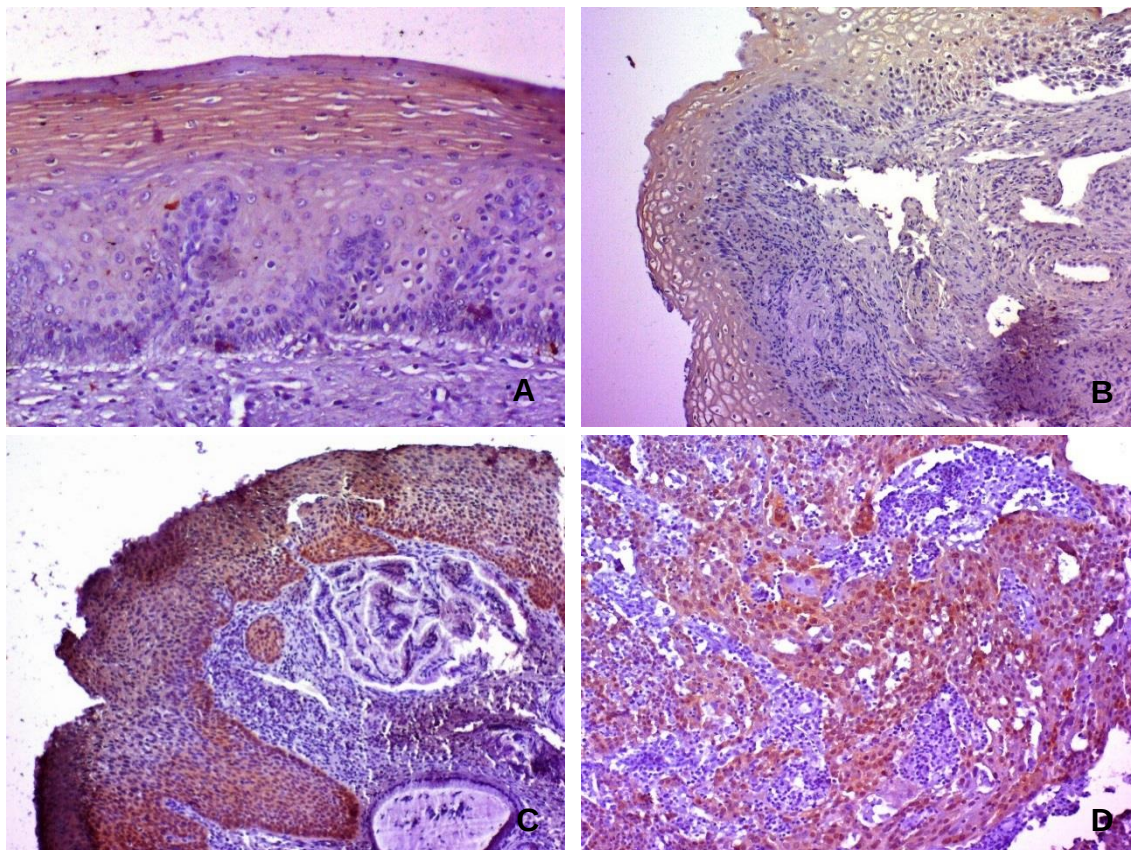
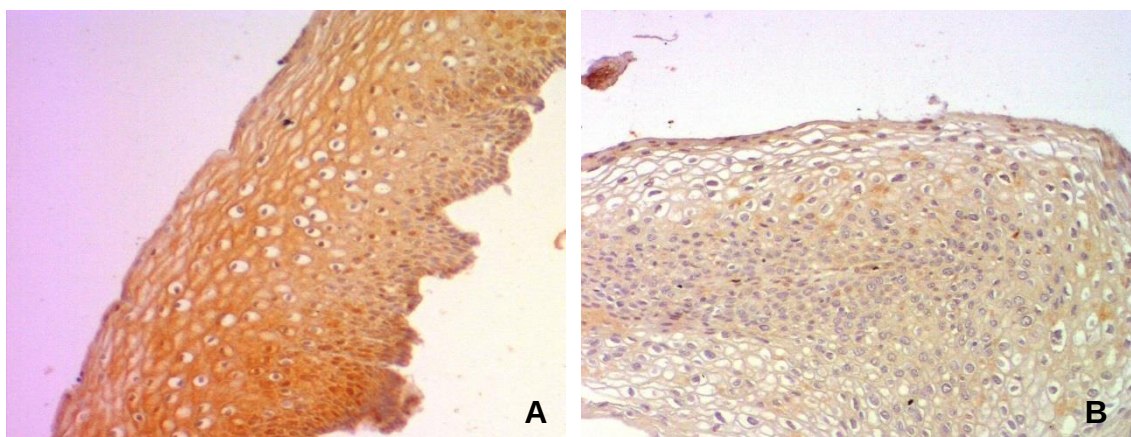


Figura 4. Imunohistoquímica para a proteína p16^{INK4a} em NIC1 (A), NIC2 (B), NIC3 (C) e Câncer (D).

Imunohistoquímica para TIMP-2

A partir das médias expressas pelo histograma foi visto que para TIMP-2 a marcação mais forte foi para os casos de NIC1, seguidos dos casos de câncer, NIC3 e NIC2 (Figura 5). Porém não apresentou valor estatisticamente significativo para essa associação, sendo o valor de p igual a 0,77.



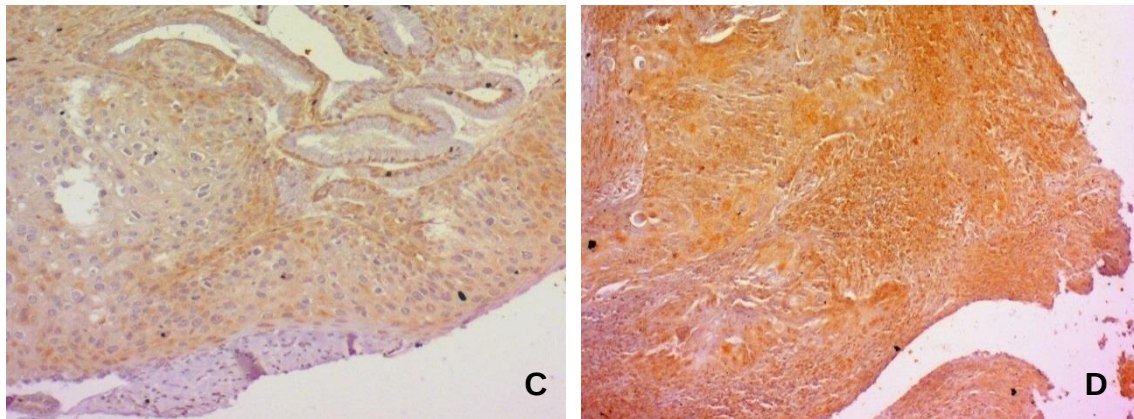


Figura 5. Imunohistoquímica para TIMP-2 em NIC1 (A), NIC2 (B), NIC3 (C) e Câncer (D).

Imunohistoquímica para MMP-3

A partir das médias expressas pelo histograma foi visto que para a MMP-3 a marcação mais forte foi para os casos de NIC2, seguidos dos casos de NIC3, NIC1 e câncer (Figura 6). Porém não apresentou valor estatisticamente significativo para essa associação, sendo o valor de p igual a 0,24.

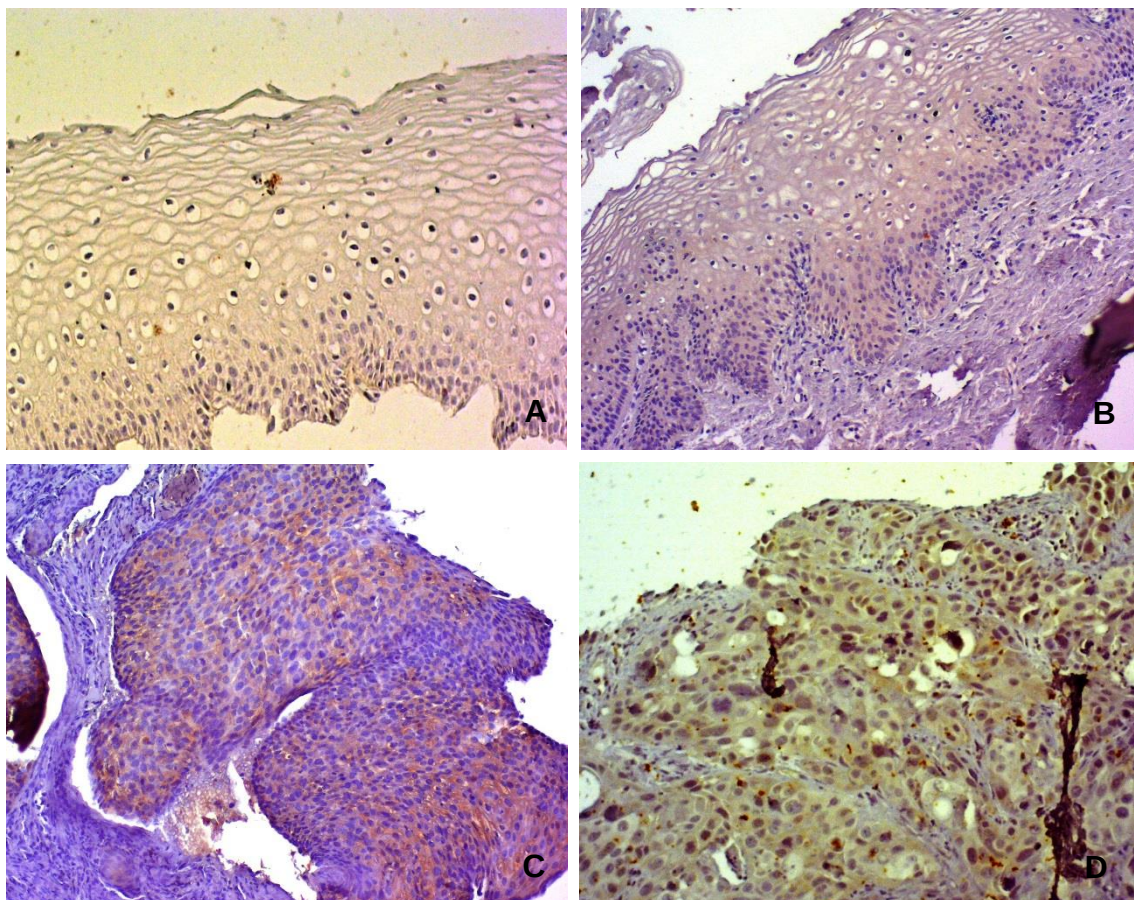


Figura 6. Imunohistoquímica para MMP-3 em NIC1 (A), NIC2 (B), NIC3 (C) e Câncer (D).

Discussão

Inicialmente as amostras foram submetidas à detecção de DNA-HPV, seguidas de genotipagem com primers específicos para HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV58.

As análises de perfis infectivos mundiais mostram que os tipos virais mais incidentes são os HPVs 16 e 18, porém em nosso estudo encontramos o HPV 16 em primeiro lugar e o HPV 31 como o segundo mais prevalente, corroborando com os resultados obtidos por Baldez da Silva et al. 2009, Mendonça et al. 2010 e Baldez da Silva et al. 2012. Contudo, alguns trabalhos também realizados com amostras da mesma região se mostraram discordantes, tais como a genotipagem realizada por Chagas et al. 2015, que encontrou o HPV-31 como o tipo viral mais incidente, seguido do HPV-16, e o estudo de Tavares et al. 2014 e Lima Jr et al. 2011, os quais encontraram o HPV-16 como o mais incidente sendo seguido pelo HPV-18.

Esses resultados de identificação dos tipos virais podem sofrer algumas diferenças por influências de alguns fatores, entre eles o tamanho da casuística. O número de amostras utilizadas em nosso trabalho foi pequeno quando comparados com outros, por exemplo: Lima Jr et al. 2011, Tavares et al. 2014, Mendonça et al. 2010 e Chagas et al. 2015, utilizaram, 120, 142, 248 e 594 casos, respectivamente. Outro fator importante é a escolha da técnica de genotipagem. Esse estudo contou com PCR utilizando primers específicos, escolha feita pelo fato dos levantamentos na região encontrarem os HPVs 16, 18, 31, 33, e 58 como os mais incidentes. Entretanto, esta técnica acaba excluindo a possibilidade de identificação completa do perfil genotípico para todos os principais tipos de HPV que infectam a cérvix humana. Técnicas opcionais também podem ser utilizadas, tais como, a PCR-RFLP que utiliza enzimas de restrição, mas demanda um alto custo laboral e problemas na interpretação no gel por conta da sobreposição das bandas e o pirosequenciamento, o qual esbarra no problema da presença de infecções múltiplas, onde há inviabilização da leitura dos resultados em decorrência da sobreposição de picos nos eletroferogramas, além de demandar um alto custo financeiro. Esta técnica se mostra muito eficiente em casos de infecção única.

Quanto ao tipo de infecção, se única ou múltipla, os nossos resultados são apoiados pelos encontrados por Chagas et al 2015, que obteve 57,3% de infecções múltiplas e 42,7% de infecções únicas.

Referente aos exames de rotina diagnóstica, nosso estudo encontrou divergências entre os resultados liberados pelo exame de rastreio, a citologia oncológica e o histopatológico. O que pode ter sido causado pelo fato da baixa especificidade e reprodutibilidade da citologia, somada à deficiência técnica da coleta, fixação e, em alguns casos a coleta não ser realizada por profissional bem treinado e experiente (LIMA et al, 2012; PINHO, MATTOS 2002). Já em relação à histologia, o fato de ser realizada a partir de biopsias dirigidas, torna mais preciso o diagnóstico, porém menos representativo de toda a área do colo uterino em relação à citologia.

Em estágios histológicos mais avançados das lesões cervicais, além do aumento da expressão das MMPs, que tem como alvo a digestão da matriz extracelular e o rompimento da membrana basal, foi possível verificar superexpressão da p16^{INK4a} e da oncoproteína E6, o que causa maior instabilidade celular e aumenta as chances do processo de invasão e metástase (TIMOSHENKO et al, 2014; HOWIE et al, 2009). De forma interessante, em 5 casos diagnosticados citologicamente como HSIL a histopatologia considerou livres de lesão. Em 4 destes foi detectado marcação intensa da reação imunohistoquímica para MMP-3 e 2 com marcação intensa para p16^{INK4a} e E6. Esses resultados poderiam ser explicados por dois fatores: 1) Problemas operacionais de coleta de biopsias ou de representação tumoral no material processado; 2) as MMP-3 estão envolvidas em lesões que tendem a evoluir a invasão devido a remodelagem da matriz extracelular nos estágios iniciais da sua liberação e por isso se mostra elevada inicialmente sendo diminuída em estágios avançados da lesão.

As MMP-3 atuam degradando colágenos do tipo II, III, IV, IX e X, proteoglicanas, fibronectinas, lamininas e elastinas (YE et al 1996), ou seja, componentes que precisam ser rompidos para promover, além da digestão da MEC, a degradação de proteínas das junções célula-célula e célula-membrana (SCHROPFER et al. 2010) o que explica o fato da expressão dessa MMP estar aumentada na maioria dos cânceres humanos quando comparados com tecidos normais (CURRAN et al, 2004; EGUCHI et al, 2008).

Na formação do microambiente tumoral o processo evolutivo da lesão exige que os níveis da síntese de MMPs sejam aumentados visando facilitar a futura migração celular. Segundo Egeblad e Werb (2002), o local de síntese de MMP-3 ocorre tanto em células tumorais, como em células endoteliais, ou até mesmo em células estromais, como nos fibroblastos. Essa afirmação corrobora com os dados obtidos em nossos experimentos e infere uma possível aplicação preditiva em análises de lesões intraepiteliais, além de esclarecer a existência de variação de sua síntese na tumorigênese.

Adicionalmente, esses resultados também nos levam a acreditar que se uma lesão cervical de baixo grau apresenta superexpressão de MMP-3 e infecção pelo HPV de alto risco, podem ter potencial elevado para progressão a invasão, uma vez que a proteína E6 dos HPV de alto risco é oncogênica e influenciam o aumento da síntese das metaloproteinases de matriz no microambiente tumoral (ZHU et al 2015), como a própria MMP-3, que pode atuar ativando outras MMPs, tais como MMP-1, MMP-7 e MMP-9 (YE et al 1996). A oncoproteína E6 altera também a funcionalidade da p53, permitindo o acúmulo de mutações e ineficiência do sistema apoptótico, resultando em mutações que levam a neoplasia (MCLAUGHLIN-DRUBIN, MÜNGER, 2009). Além disso, mais estudos mostram que as oncoproteínas do HPV estão diretamente relacionadas com a progressão das lesões cervicais por estarem envolvidas na síntese e ativação de algumas MMPs, como a MMP-2, MMP-9, MMP-MT1 (CARDEAL et al, 2012), MMP-11 e MMP-12 (VALDIVIA et al 2011).

Dessa forma, genotipar o HPV passa a ser uma informação importante para o prognóstico da paciente, pois somente os HPV de alto risco podem superexpressar as proteínas E6 e E7 levando a invasão. Assim, diante de casos com citologia negativa na triagem, mas genotipagem positiva para HPV de alto risco, essas pacientes passariam para um grupo diferenciado de segmento, o qual poderia ser adicionado a identificação da MMP-3, que uma vez positiva poderia ser uma informação adicional a na prática clínica.

Referente a análise da expressão do inibidor tissular de metaloproteinases, TIMP-2, encontramos uma diferença de intensidade de marcação entre os casos considerados como negativos para lesão e todos os outros que apresentaram lesões. Dados estes que divergem dos encontrado por Branca et al, 2006, que relataram que os padrões de expressão em 60% dos casos de NIC 3

apresentavam o mesmo nível de marcação que o tecido normal. Ao analisarmos a intensidade de marcação para o TIMP-2 nos casos diagnosticados com lesões, vimos que os grupos de lesões que apresentaram uma marcação mais intensa foram nos casos de NIC-1 e câncer e as menos intensas foram em NIC-3 e NIC-2. Dados esses que se mostraram controversos ao serem comparados com a expressão da MMP-3, que teve a marcação mais intensa nos casos de NIC-2 e NIC-3, e a marcação menos intensa nos casos de NIC-1 e câncer. O que pode evidenciar que o aumento de expressão de um acaba como a diminuição relativa do outro, levando a perda do equilíbrio dessas moléculas nos tecidos. No entanto, os dados sobre o TIMP-2 ainda são controversos, onde se verifica expressões nas células tumorais de carcinoma cervical e estroma, porém encontrado em níveis baixos em outros tumores. Segundo Steller-Stevenson, 2008, aparentemente este inibidor parece apresentar um papel duplo, atuando como inibidor de MMP ou até mesmo como um ativador.

Referente a análise imunohistoquímica para E6 e p16 vimos que elas são fortes indicadoras de critérios de malignidade, uma vez que as marcações mais intensas foram encontradas nos casos de câncer, o que se explica pela alta taxa de multiplicação celular, e não houve uma diferença significativa na intensidade de marcação quando comparados os graus de lesões pré-malignas ou os casos sem lesão. Já na pesquisa desenvolvida por Cai e Han 2015, não encontraram nenhuma associação entre a expressão da p16^{INK4a} com o grau das lesões cervicais.

Com o exposto, algumas proteínas, como a MMP-3, TIMP-2, p16^{INK4a} e a E6, podem vir a atuar contribuindo para elaboração de um quadro diagnóstico mais fidedigno das lesões cervicais em pacientes identificadas como portadores de lesões nos exames de triagem, uma vez que essas proteínas podem ser identificadas com o auxílio de anticorpos, imunocitoquimicamente ou imunohistologicamente, e indicar juntamente com o resultado citológico e com a identificação do HPV, o provável estágio em que se encontra o desenvolvimento das lesões cervicais.

Referências

Argüello-Ramírez, J.; Pérez-Cárdenas E.; Delgado-Chávez R.; Solorza-Luna, G.; Villa-Treviño, S.; Arenas-Huertero, F. Matrix metalloproteinases-2, -3, and -9 secreted by explants of benign and malignant lesions of the uterine cervix. **Int J Gynecol Cancer**. 2004;14(2):333-40.

Baldez da Silva, M. F.; Chagas, B. S.; Guimarães, V.; Katz, L. M.; Felix, P. M.; Miranda, P. M.; Lima, A. A.; Arraes, L. C.; Martins, D. B.; Lima Filho, J. L.; Stocco, R. C.; Crovella, S.; Freitas, A. C.; Beçak, W. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. **Genet Mol Res**. 2009;8(4):1437-43.

Baldez da Silva, M. F.; Guimarães, V.; Silva, M. A.; Medeiros do Amaral, C. M.; Beçak, W.; Stocco, R. C.; Freitas, A. C.; Crovella, S. Frequency of human papillomavirus types 16, 18, 31 and 33 and sites of cervical lesions in gynecological patients from Recife, Brazil. **Genet Mol Res**. 2012;11(1):462-6.

Braicu, E. I.; Gasimli, K.; Richter, R.; Nassir, M.; Kümmel, S.; Blohmer, J. U.; Yalcinkaya, I.; Chekerov, R.; Ignat, I.; Ionescu, A.; Mentze, M.; Fotopoulou, C.; Pop, C.; Lichtenegger, W.; Sehouli, J.; Tumor Bank Ovarian Cancer (TOC); German North Eastern Society for Gynecological Oncology (NOGGO). Role of serum VEGFA, TIMP2, MMP2 and MMP9 in monitoring response to adjuvant radiochemotherapy in patients with primary cervical cancer--results of a companion protocol of the randomized NOGGO-AGO phase III clinical trial. **Anticancer Res**. 2014;34(1):385-91.

Branca, M.; Ciotti, M.; Giorgi, C.; Santini, D.; Di Bonito, L.; Costa, S. et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its tissue inhibitor (TIMP-2) are prognostic factors in cervical cancer, related to invasive disease but not to high-risk human papillomavirus (HPV) or virus persistence after treatment of CIN. **Anticancer Res**. 2006;26(2B):1543-56.

Cai, S.; Han, K. Research on expression and importance of p53, p16 and VEGF-C in cervical cancer. **J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)**. 2015;44(7):639-45.

Cardeal LB, Boccardo E, Termini L, Rabachini T, Andreoli MA, di Loreto C, Longatto Filho A, Villa LL, Maria-Engler SS. HPV16 oncoproteins induce MMPs/RECK-TIMP-2 imbalance in primary keratinocytes: possible implications in cervical carcinogenesis. **PLoS One**. 2012;7(3):e33585.

Chagas, B. S.; Batista, M. V.; Crovella, S.; Gurgel, A. P.; Silva Neto, J. da C.; Serra, I. G.; Amaral, C. M.; Balbino, V. Q.; Muniz, M. T.; Freitas, A. C. Novel E6 and E7 oncogenes variants of human papillomavirus type 31 in Brazil

an women with abnormalcervical cytology. **Infect Genet Evol.** 2013 Jun;16:13-8.

Chagas, B. S.; Comar, M.; Gurgel, A.P.; Paiva, S.; Seraceni, S.; de Freitas, A. C.; Crovella, S. Association Study between Cervical Lesions and Single or Multiple Vaccine-Target and Non-Vaccine Target Human Papillomavirus (HPV) Types in Women from Northeastern Brazil. **PLoS One.** 2015;10(7):e0132570.

Curran, S.; Dundas, S. R.; Buxton, J.; Leeman, M. F.; Ramsay, R.; Murray, G. I. Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. **Clin Cancer Res.** 2004;10:8229–34.

Eguchi, T.; Kubota, S.; Kawata, K.; Mukudai, Y.; Uehara, J.; Ohgawara, T.; Ibaragi, S.; Sasaki, A.; Kuboki, T.; Takigawa, M. Novel Transcription Factor-Like Function of Human Matrix Metalloproteinase 3 Regulating the CTGF/CCN2 Gene. **MOL CEL BIOLOGY.** 2008;2391–2413.

Gustinucci, D.; Giorgi Rossi, P.; Cesarini, E.; Broccolini, M.; Bulletti, S.; Carlan, A.; D'angelo, V.; D'amico, M. R.; Di Dato, E.; Galeazzi, P.; Malaspina, M.; Martinelli, N.; Spita, N.; Tintori, B.; Gaiamo, M. D.; Passamonti, B. Use of Cytology, E6/E7 mRNA, and p16INK4a-Ki-67 to Define the Management of Human Papillomavirus (HPV)-Positive Women in Cervical Cancer Screening. **Am J Clin Pathol.** 2016;145(1):35-45.

Howie, H. L.; Katzenellenbogen, R. A.; Galloway, D. A. Papillomavirus E6 proteins. **Virology.** 2009;384(2):324-34.

Kaewprag, J.; Umnajvijit, W.; Ngamkham, J.; Ponglikitmongkol, M. HPV16 oncoproteins promote cervical cancer invasiveness by upregulating specific matrix metalloproteinases. **PLoS One.** 2013;8(8):e71611.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics** 1977;33:159-174.

Lima Jr, S. F.; Fernandes, M. C.; Heráclio, S. A.; de Souza, P. R.; Maia, M. M. Prevalence of human papillomavirus genotypes: comparison between three detection methods in patients of Pernambuco, Brazil. **Rev Bras Ginecol. Obstet.** 2011;33(10):315-20.

Lima, T. M.; Lessa, P. R. A.; Freitas, L. V.; Teles, L. M. R.; Aquino, P. S.; Damasceno, A. K. C.; Pinheiro, A. K. B. Análise da capacidade diagnóstica dos exames preventivos do câncer de colo uterino. **Acta paul. enferm.** 2012; 25(5).

McLaughlin-Drubin, M. E.; Münger, K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. **Virus Res.** 2009;143(2):195-208.

Mendonça, V. G.; Guimarães, M. J.; de Lima Filho, J. L.; de Mendonça, C. G.; Martins, D. B.; Crovella, S.; de Alencar, L. C. Human papillomavirus cervical infection: viral genotyping and risk factors for high-grade

squamous intraepithelial lesion and cervix cancer. **Rev Bras Ginecol Obstet.** 2010;32(10):476-85.

Mühlen, S.; Behren, A.; Iftner, T.; Simon, C. Influence of HPV16 E2 and its localisation on the expression of matrix metalloproteinase-9. **Inter J Oncol.** 2010;37:337-345.

National Center for Biotechnology Information. MMP3 matrix metalloproteinase 3 [Homo sapiens (human)]. **NCBI Gene** Gene ID: 4314. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4314>>. Acesso em 10/12/2015.

Nobre, R.J.; De Almeida, L.P.; Martins, T.C. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. **J Clin Virol.** 2008;42(1):13-21.

Pinho, A. A.; Mattos, M. C. F. I. Validade da citologia cervicovaginal na detecção de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de colo de útero. **J Bras Patol Med Lab.** 2002;38(3):225-231.

Pittayakhajonwut D, Angeletti PC. Viral trans-factor independent replication of Human Papillomavirus genomes. **Virol J.** 2010;7:123.

Rajkumar, T.; Sabitha, K.; Vijayalakshmi, N.; Shirley, S.; Bose, M. V.; Gopal, G.; Selvaluxmy, G. Identification and validation of genes involved in cervical tumourigenesis. **BMC Cancer.** 2011;11:80.

Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. **J Clin Oncol.** 2009;27(31):5287-97.

Sato, T.; Ota, T.; Watanabe, M.; Imada, K.; Nomizu, M.; Ito, A. Identification of an active site of EMMPRIN for the augmentation of matrix metalloproteinase-1 and -3 expression in a co-culture of human uterine cervical carcinoma cells and fibroblasts. **Gynecol Oncol.** 2009;114:337–342.

Schropfer, A.; Kammerer, U.; Kapp, M.; Dietl, J.; Feix, S.; Anacker, J. Expression pattern of matrix metalloproteinases in human gynecological cancer cell lines. **BMC Cancer.** 2010;10:553.

Stetler-Stevenson, W. G. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. **Sci Signal.** 2008;1(27):re6.

Tavares, M. C.; de Macêdo, J. L.; de Lima Júnior, S. F.; de Andrade Heráclio, S.; Amorim, M. M.; de Mascena Diniz Maia, M.; de Souza, P.R. Chlamydia trachomatis infection and human papillomavirus in women with cervical neoplasia in Pernambuco-Brazil. **Mol Biol Rep.** 2014;41(2):865-74.

Timoshenko, O.S.; Gureeva, T. A.; Kugaevskaia, E. V.; Solov'eva, N. I. Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and the regulators of its

activity as invasive factors in squamous cell cervical carcinomas. **Biomed Khim.** 2014;60(6):683-8.

Valdivia A, Peralta R, Matute-González M, García Cebada JM, Casasola I, Jiménez-Medrano C, Aguado-Pérez R, Villegas V, González-Bonilla C, Manuel-Apolinar L, Ibáñez M, Salcedo M. Co-expression of metalloproteinases 11 and 12 in cervical scrapes cells from cervical precursor lesions. **Int J Clin Exp Pathol.** 2011;4(7):674-82.

Winer, R. L.; Kiviat, N. B.; Hughes, J. P.; Adam, D. E.; Lee, S. K.; Kuypers, J. M.; et al. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. **J Infect Dis.** 2005;191:731–738.

Wu, S.F.; Meng, L.; Wang, S.X.; Ma, D. A comparison of four screening methods for cervical neoplasia. International Federation of Gynecology and Obstetrics. **Published by Elsevier Ireland Ltd.** 2005.

Ye, S.; Eriksson, P.; Hamsten, A.; Kurkinen, M.; Humphries, S. E.; Henney, A. M. Progression of coronary atherosclerosis is associated with common genetic variant of the humanstromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. **J Biol Chem.** 1996;271(22):13055-60.

Zhu, D.; Ye, M.; Zhang, W. E6/E7 oncoproteins of high risk HPV-16 upregulate MT1-MMP, MMP-2 and MMP-9 and promote the migration of cervical cancer cells. **Int J Clin Exp Pathol.** 2015;8(5):4981-4989.

Zielinski, G. D.; Snijders, P. J.; Rozendaal, L.; Voorhorst, F. J.; van der Linden, H. C.; Runsink, A. P.; et al. HPV presence precedes abnormal cytology in women developing cervical cancer and signals false negative smears. **Br J Cancer.** 2001;85: 398–404.

Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer.** 2002;2(5):342–50.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A expressão imunohistoquímica para as proteínas metaloproteinase de matriz 3 (MMP-3), inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz 2 (TIMP-2), p16^{INK4a} e oncoproteína E6/HPV-16/18, não mostraram ser estatisticamente significativas frente as amostras de lesões cervicais pelo teste de associação ANOVA, sendo o valor de p encontrado maior de 0,05.
- A expressão imunohistoquímica para as proteínas metaloproteinase de matriz 3 (MMP-3), inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz 2 (TIMP-2), p16^{INK4a} e oncoproteína E6/HPV-16/18, não mostraram ser estatisticamente significativas frente os HPVs 16, 18, 31, 33 e 58, pelo teste de associação ANOVA, sendo o valor de p encontrado maior de 0,05.
- Este estudo sugere que a oncoproteína E6 e a proteína p16INK4a são biomarcadores biologicamente úteis para aumentar a precisão do diagnóstico precoce de câncer de colo do útero. Já para casos de lesões pré-malignas os biomarcadores biologicamente úteis seriam a MMP-3 e o TIMP-2.
- Houve uma grande discordância entre os diagnósticos citológicos e histológicos. No entanto, alguns resultados que mostraram ser negativos na histologia e positivos no exame citológico mostraram-se reativos para a imunohistoquímica dos biomarcadores avaliados nesse estudo.

REFERÊNCIAS

- Argüello-Ramírez, J.; Pérez-Cárdenas E.; Delgado-Chávez R.; Solorza-Luna, G.; Villa-Treviño, S.; Arenas-Huertero, F. Matrix metalloproteinases-2, -3, and -9 secreted by explants of benign and malignant lesions of the uterine cervix. **Int J Gynecol Cancer**. 2004;14(2):333-40.
- Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, Ridder R; European CINtec Histology Study Group. Conjunctive p16^{INK4a} testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Am J Clin Pathol**. 2010;133(3):395-406.
- Boicea, A.; Patrascu, A.; Surlin, V.; Iliescu, D.; Schenker, M.; Chiutu, I. Correlations between colposcopy and histologic results from colposcopically directed biopsy in cervical precancerous lesions. **Rom J of Morpho and Embry**. 2012;53:735–741.
- Boonlikit, S. Correlation between Reid's colposcopic index and histologic results from colposcopically directed biopsy in differentiating high-grade from low-grade squamous intraepithelial lesion at Rajavithi Hospital. **Med Assoc Thai**. 2011;94:59-65.
- Bruni L, Diaz M, Castellsagué M, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical Human Papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. **J Infect Dis**. 2010;202(12):1789–99.
- Burn, E. M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Clin Microbiol Rev**. 2003;16:1-17.
- Cardeal LB, Boccardo E, Termini L, Rabachini T, Andreoli MA, di Loreto C, Longatto Filho A, Villa LL, Maria-Engler SS. HPV16 oncoproteins induce MMPs/RECK-TIMP-2 imbalance in primary keratinocytes: possible implications in cervical carcinogenesis. **PLoS One**. 2012;7(3):e33585.
- Cattani P, Zannoni GF, Ricci C, D'Onghia S, Trivellizzi IN, Di Franco A et al. Clinical performance of human papillomavirus E6 and E7 mRNA testing for high-grade lesions of the cervix. **J Clin Microbiol**. 2009;47(12):3895-901.
- Cuzick, J.; Bergeron, C.; Von Knebel Doeberitz, M. New technologies and procedures for cervical cancer screening. **Vaccine**. 2012;30:107-116.
- D'Abramo, C.M.; Archambault, J. Small molecule inhibitors of human papillomavirus protein - protein interactions. **Open Virol J**. 2011;5:80-95.
- De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. **Virology**. 2004;324(1):17-27.
- Dehn D, Torkko KC, Shroyer KR. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. **Cancer**. 2007;111(1):1-14.

Dong Q, Yu D, Yang CM, Jiang B, Zhang H. Expression of the reversion- inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs and matrix metalloproteinase-14 in neuroblastoma and the role in tumour metastasis. **Int J Exp Pathol**. 2010;91(4):368–73.

Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clin Sci (Lond)**. 2006;110(5):525-41.

Doorbar J. The Papillomavirus life cycle. **J Clin Virol**. 2005;32:7–15.

Duensing S, Münger K. Centrosome abnormalities and genomic instability induced by human papillomavirus oncoproteins. **Prog Cell Cycle Res**. 2003;5:383-91.

Egeblad, M.; Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer**. 2002;2:161-174.

Eguchi, T.; Kubota, S.; Kawata, K.; Mukudai, Y.; Uehara, J.; Ohgawara, T.; Ibaragi, S.; Sasaki, A.; Kuboki, T.; Takigawa, M. Novel Transcription Factor-Like Function of Human Matrix Metalloproteinase 3 Regulating the CTGF/CCN2 Gene. **Mol Cel Biology**. 2008;2391–2413.

Evander, M.; Frazer, I. H.; Payne, E. Identification of the $\alpha 6$ integrina as a candidate receptor for papilomavirus. **J Virol**. 1997;71:5449-59.

Ferro, A.B. Imunocitoquímica. Instituto Politécnico de Lisboa - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa. Licenciatura em Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica. 2010.

Frazer I. Correlating immunity with protection for HPV infection. **Int J Infect Dis**. 2007;11(Suppl. 2):S10–6.

Globocan. Cervical Cancer, Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. **IARC**. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp>

Greenberg, M. D.; Reid's colposcopic index. In: APGAR, B.S.; BROTZMAN, G.L.; SPITZER, M. Colposcopy: principles and practice: an integrated textbook and atlas. **Editora Philadelphia**. 1º Ed. 2002.

Hagemann, T.; Balkwill, F.; Lawrence, T. Inflammation and cancer: a double-edged sword. **Cancer Cell**. 2007;12(4):300-1.

Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal Papillomavirus infection in young women. **N Engl J Med** 1998;338(7):423–8.

Hwang SJ, Shroyer KR. Biomarkers of cervical dysplasia and carcinoma. **J Oncol**. 2012;507.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**; 2015. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/index.asp>

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Tipos de Câncer: Colo do Útero. Rio de Janeiro: **INCA**; 2014. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/definicao

Johansson C, Schwartz S. Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. **Nat Rev Microbiol**. 2013;11(4):239-51.

Kaneshima, E.N.; Bidoia, C.C.G.; Gabriel, M.; Suzuki, L.E.; Consolaro, M.E.L. Aplicação do Método PCR-RFLP para Tipagem de HPV em Infecções Cervicais de Pacientes Atendidas no Lepac, Universidade Estadual de Maringá. **Acta Scientenarium Maringá**. 2001;23:731-737.

Koss, L.G.; Gompel, C. Introdução à Citopatologia Ginecológica: com Correlações Histológicas e Clínicas. **Editores Roca**. 1ª Ed. 2006.

Libra M, Scalisi A, Vella N, Clementi S, Sorio R, Stivala F et al. Uterine cervical carcinoma: role of matrix metalloproteinases (review). **Int J Oncol**. 2009;34(4):897-903.

McCawley, L. J.; Matrisian, L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore. **Current Opinion in Cell Biology**, 2000;13:534-540.

Mendes, O.; Kim, H.T.; Stoica, G. Expression of MMP2, MMP9 and MMP3 in breast cancer brain metastasis in a rat model. **Clin Exp Metastasis**. 2005;22(3):237-46.

Missaoui N, Trabelsi A, Hmissa S, Fontanière B, Yacoubi MT, Mokni M et al. p16^{INK4a} overexpression in precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix in Tunisian women. **Pathol Res Pract**. 2010;206(8):550-5.

Moody, C.A.; Laimins, L.A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nat Rev Cancer**. 2010;10:550-560.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**. 2003; 348:518-527.

Nagata, M.; Fujita, H.; Ida, H.; Hoshina, H.; Inoue, T.; Seki, Y.; Ohnishi, M.; Ohyama, T.; Shingaki, S.; Kaji, M.; Saku, T.; Takagi, R. Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. **Int J Cancer**. 2003;106(5):683-9.

National Center for Biotechnology Information. MMP3 matrix metalloproteinase 3 [Homo sapiens (human)]. **NCBI Gene** Gene ID: 4314. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4314>>. Acesso em 10/12/2015.

Nishiwak, M.; Yamamoto, T.; Tone, S.; Murai, T. Genotyping of Human Papillomaviruses by a Novel One-Step Typing Method with Multiplex PCR and Clinical Applications. **J of Clinic Microbiology**. 2008;46:1161.

Nobre, R.J.; De Almeida, L.P.; Martins, T.C. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. **J Clin Virol**. 2008;42(1):13-21.

Patel, D.;Huang, S.M.; Baglia, L.A.; McCance, D.J. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. **EMBO J**. 1999;18:5061–5072.

Pires-Alves, M.; Novais, C.M.; Silva, F.F. PCR em Tempo Real - Uma Inovação Tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. 2004;33.

Pittayakhajonwut D, Angeletti PC. Viral trans-factor independent replication of Human Papillomavirus genomes. **Virol J**. 2010;7:123.

Rajcáni J, Adamkov M, Hybenová J, Moráveková E, Lauko L, Felcanová D, Bencat M. Detection of regulatory protein p16^{INK4a} in the dysplastic cervical squamous cell epithelium is a diagnostic tool for carcinoma prevention. Laboratórium patologickej anatómie, Alpha Medical a.s., Martin. **Cesk Patol**. 2009;45(4):101-7.

Rajkumar, T.; Sabitha, K.; Vijayalakshmi, N.; Shirley, S.; Bose, M. V.; Gopal, G.; Selvaluxmy, G. Identification and validation of genes involved in cervical tumourigenesis. **BMC Cancer**. 2011;11:80.

Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. **J Clin Oncol**. 2009;27(31):5287-97.

Schropfer, A.; Kammerer, U.; Kapp, M.; Dietl, J.; Feix, S.; Anacker, J. Expression pattern of matrix metalloproteinases in human gynecological cancer cell lines. **BMC Cancer**. 2010;10:553.

Silva Neto, J. C. Citologia Clínica do Trato Genital Feminino. **Editora Revinter**. 1ª Ed. 2012.

Silva, A.; Alves, C.; Gonçalves, D.; Malheiro, D.; Costa, F. R.; Alves, S. Stop Cancro do Colo do Útero!!!. 2008. Disponível em: <<http://biocientifico.blogspot.com.br/2008/10/stop-cancro-do-colo-do-tero.html>>. Acesso em: 12 de Dezembro de 2015.

Silva, E. D. C.; Smanioto, R.; Campos, S. F.; Hass, P. Papilomavírus Humano. **Rev Bras de Anál Clínic.** 2004;36:137-142.

Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda system. **JAMA** 2002;287(16):2114–9.

Solomon, D.; Nayar, R. Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal-Definições, Critérios e Notas Explicativas. **Editora Revinter.** 2º Ed. 2005.

Steben M, Duarte-Franco E. Human Papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. **Gynecol Oncol** 2007;107(2 Suppl 1):S2–5.

Sternlicht MD, Bissell MJ, Werb Z. The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. **Oncogene.** 2000;19(8):1102–13. Review.

Sternlicht, M.D.; Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol.** 2001;17:463-516.

Stetler-Stevenson WG. The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. **Cancer Metastasis Rev Mar.** 2008;27(1): 57–66. Review.

Tsukfuji, R.; Tagawa, K.; Hatamochi, A.; Shinkai, H. Expression of matrix metalloproteinase-1, -2, -3 in squamous cell carcinoma and actinic keratosis. **Br J Cancer.** 1999;80:1087-1091.

Termini, L.; Villa, L. L. Biomarcadores na Triagem do Câncer do Colo Uterino. **J bras Doenças Sex Transm.** 2008;20(2):125-131.

Valdivia A, Peralta R, Matute-González M, García Cebada JM, Casasola I, Jiménez-Medrano C, Aguado-Pérez R, Villegas V, González-Bonilla C, Manuel-Apolinar L, Ibáñez M, Salcedo M. Co-expression of metalloproteinases 11 and 12 in cervical scrapes cells from cervical precursor lesions. **Int J Clin Exp Pathol.** 2011;4(7):674-82.

Wallin, K. L.; Wiklund, F.; Angstrom, T.; Bergman, F.; Stendahl, U.; Wadell, G.; et al. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. **N Engl J Med.** 1999;341:1633–1638.

Winer, R. L.; Kiviat, N. B.; Hughes, J. P.; Adam, D. E.; Lee, S. K.; Kuypers, J. M.; et al. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. **J Infect Dis.** 2005;191:731–738.

Woodman, C.B.; Collins, S.I.; Young, L.S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nat Rev Cancer.** 2007;7(1):11-22.

Wu, S.F.; Meng, L.; Wang, S.X.; Ma, D. A comparison of four screening methods for cervical neoplasia. International Federation of Gynecology and Obstetrics. **Published by Elsevier Ireland Ltd.** 2005.

Ye, S.; Eriksson, P.; Hamsten, A.; Kurkinen, M.; Humphries, S. E.; Henney, A. M. Progression of coronary atherosclerosis is associated with common genetic variant of the humanstromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. **J Biol Chem.** 1996;271(22):13055-60.

Zielinski, G. D.; Snijders, P. J.; Rozendaal, L.; Voorhorst, F. J.; van der Linden, H. C.; Runsink, A. P.; et al. HPV presence precedes abnormal cytology in women developing cervical cancer and signals false negative smears. **Br J Cancer.** 2001;85: 398–404.

Zur Hausen H. Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. **Biochim Biophys Acta.** 1996;1288(2):F55–78.

Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer.** 2002;2(5):342–50.

Zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. **Proc Assoc Am Physicians.** 1999;111(6):581–7.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa: *Estudo molecular da carcinogênese das lesões cervicais: da pré-invasão a invasão*.

O motivo que nos leva a estudar o problema é devido ao grande número de mulheres que estão suscetíveis a desenvolver o câncer de colo uterino.

O procedimento de coleta de material será através de uma coleta padronizada de exame de prevenção (Papanicolaou) e, quando detectadas alterações no exame de colposcopia, será realizada biópsia de fragmento da lesão para avaliação histológica.

Existe um desconforto mínimo para você se submeter à coleta do material para citologia e histologia, sendo que se justifica pelo benéfico da prevenção ao câncer de colo uterino, caso seja diagnosticado.

A paciente que for diagnosticada com alterações será devidamente esclarecida sobre os riscos e orientada a procurar um especialista na área, bem como serão indicados os serviços mais próximos de atendimento ao público.

Você será esclarecida sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados do exame laboratorial serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELA PARTICIPANTE:

Eu, _____ fui informada dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O professor orientador Jacinto da Costa Silva Neto certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Em caso de dúvidas poderei chamar o prof. Jacinto da Costa Silva Neto, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, 50.760-420, telefone (81) 9726-9509 ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, S/N Cidade Universitária, 50.670-901 – Recife-PE, Fone: 81-2126-8588.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
------	----------------------------	------

Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
------	---------------------------	------

Nome	Assinatura da Testemunha	Data
------	--------------------------	------

Nome	Assinatura da Testemunha	Data
------	--------------------------	------

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/CCS/UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO MOLECULAR DA CARCINOGENESE DAS LESÕES CERVICAIS: DA PRÉ-
INVASÃO A INVASÃO

Pesquisador: Jacinto da Costa Silva Neto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 17068913.8.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 413.486

Data da Relatoria: 02/10/2013

Apresentação do Projeto:

É um projeto de pesquisa que visa Analisar a progressão das lesões cervicais, desde suas alterações citológicas mínimas (ASC-US), histológicas (NIC-I) até a invasão (carcinoma cervical e adenocarcinoma) correlacionando as expressões das proteínas E5, E6, E7 e Metaloproteinases da matriz e inibidores (MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e RECK) através das técnicas de citologia oncológica, histopatologia, imunohistoquímica, detecção, sequenciamento e genotipagem para vários tipos de DNA-HPV e análise da expressão dos genes E6 e E7 por RNAm através da técnica de PCR em tempo real. O perfil das proteínas estudadas poderá esclarecer melhor os mecanismos envolvidos na progressão tumoral, auxiliando no diagnóstico, na precisão diagnóstica das lesões, conforme seu grau de estadiamento e na terapêutica que envolvem inibidores de MMP.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Correlacionar o perfil genotípico das infecções por HPV, a expressão dos genes E5, E6, E7, proteína p16INK4A e das metaloproteinases em mulheres portadoras de lesões cervicais em vários estágios de progressão.

Objetivo Secundário: Verificar o perfil genotípico dos HPV presentes em mulheres portadoras de lesões cervicais; Correlacionar os genótipos encontrados com os graus de

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600

UF: PE **Município:** RECIFE

Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 413.486

lesões cervicais; Conhecer os níveis de expressão dos genes E5, E6, E7, proteína p16INK4A e das Metaloproteínas em diferentes graus de lesões cervicais; Associar a expressão de E5, E6, E7 e Metaloproteínas; Associar a expressão de Metaloproteínas, E5, E6 e E7 aos diagnósticos citológico, histológico e colposcópico; Constatar a taxa de multifecções, relacionando com o grau histológico da lesão; Avaliar os cofatores envolvidos com a infecção por HPV.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O presente estudo não trará nenhum risco adicional às mulheres participantes, visto que iremos estudar os resultados obtidos entre os exames complementares de diagnóstico citológico, colposcópico e anátomo patológico realizar os experimentos propostos com o material remanescente das técnicas empregadas de rotina do serviço hospitalar nas mulheres que preencham os critérios de inclusão. Para a obtenção de peças para o estudo anátomo patológico, usaremos a biópsia dirigida, segundo a técnica usual e usaremos para tal a pinça de biópsia tipo saca-bocados como a Gaylor-Medina.

Benefícios: Ao participar desta pesquisa as pacientes não terão nenhum benefício direto, pois o procedimento seria feito de qualquer maneira, seguindo as técnicas e protocolos estabelecidos pelo Ministério da Saúde. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre as lesões do colo uterino, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa contribuir no diagnóstico e tratamento precoce das lesões cervicais

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo será realizado através do método observacional, analítico transversal que visa contribuir com o conhecimento dos eventos moleculares do HPV e hospedeiro, verificando os genótipos presentes e a expressão das oncoproteínas virais nos diversos graus de lesões cervicais, ao mesmo tempo em que, pela identificação dos tipos virais envolvidos nestas lesões, poderá contribuir, em futuro próximo, para a adequação de programas de rastreio e vacinação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto fará uso de amostras já coletadas para o projeto „Expressão das oncoproteínas virais E6, E7 e de p16 em portadoras de neoplasias intraepiteliais e invasoras do colo do útero“, coordenado pela pesquisadora Marilea de Lima Guimarães e aprovado pelo CEP/CCS/UFPE sob o CAAE: 08307612.8.0000.5208 dispensando assim o uso de TCLEs. Portanto, termos apresentados satisfatórios.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 413.486

Recomendações:

Não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de "Notificação" e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado.

RECIFE, 02 de Outubro de 2013

Assinador por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br