

MIRELLA CRISTINA PEREIRA DE LIMA

**ESTUDO IMUNOHISTOQUIMICO DA EXPRESSÃO DE
INIBIDORES DE METALOPROTEINASES DA MATRIZ
TIMP-2 E RECK NAS LESÕES E CÂNCER CERVICAL**



Recife

2015

MIRELLA CRISTINA PEREIRA DE LIMA

**ESTUDO IMUNOHISTOQUIMICO DA EXPRESSÃO DE
INIBIDORES DE METALOPROTEINASES DA MATRIZ
TIMP-2 E RECK NAS LESÕES E CÂNCER CERVICAL**

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

Recife

2015

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

L732e Lima, Mirella Cristina Pereira de.
Estudo imunohistoquímico da expressão de inibidores de metaloproteinases da matriz timp-2 e reck nas lesões e câncer cervical / Mirella Cristina Pereira de Lima. – Recife: O autor, 2015.
59 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Jacinto da Costa Silva Neto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2015.
Inclui referências e anexos.

1. Papillomavírus humano. 2. Displasia do colo do útero. 3. metaloproteinases da matriz. 4. Inibidores teciduais de metaloproteinases. I. Silva Neto, Jacinto da Costa (Orientador). II. Título.

616.07

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2015-195)

MIRELLA CRISTINA PEREIRA DE LIMA

**ESTUDO IMUNOHISTOQUIMICO DA EXPRESSÃO DE
INIBIDORES DE METALOPROTEINASES DA MATRIZ
TIMP-2 E RECK NAS LESÕES E CÂNCER CERVICAL**

Dissertação aprovada em: 11.09.2015

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas (Dep. de Anatomia CCB - UFPE)

Prof. Dr. Luiz Lucio Soares da Silva (Dep. de Histologia e Embriologia - UFPE)

Prof^ª.Dr^ª. Adrya Lucia Peres Bezerra de Medeiros (Associação Caruaruense de Ensino Superior -Faculdade ASCES- Caruaru-PE)

Recife

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

R E I T O R

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE- REITOR

Prof. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Sousa Ramos

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

R E C I F E

2015

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente a Deus por ter me dado essa grande oportunidade e ter me guiado até aqui.

Ao professor Jacinto da Costa Silva Neto que considero um excelente professor e orientador, sempre auxiliando nas incontáveis dúvidas que surgiram durante a realização deste trabalho. Agradeço também ao professor e coorientador Antônio Carlos de Freitas que sempre se mostrou disposto a nos auxiliar quando tivemos dúvidas. É claro, que acreditaram em meu potencial de uma forma a que eu não acreditava ser capaz de corresponder. Sempre disponíveis e dispostos a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro do mestrado para absorver algum tipo de conhecimento.

À equipe do Laboratório de Estudos Citológicos e Moleculares (LPCM) pelo companheirismo, amizade, pela infinita disponibilidade de todos, pelos ensinamentos e por nos ajudarem na conduta deste trabalho.

Gostaria de agradecer a equipe do Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE) que nos acompanharam com total dedicação e companheirismo.

À minha companheira de pesquisa e grande amiga Lianne D'oleron sempre presente em todos os momentos, pelas inúmeras ligações atendidas, pelas inúmeras mensagens e emails respondidos, sou muito grata a Deus por tê-la colocado em meu caminho.

À meus pais, Gilvan e Betânia, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam A MELHOR de todas, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser A MELHOR, mas a fazer o melhor de mim.

À meu querido namorado, Jackson, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado.

À meus amigos do mestrado, pelos momentos divididos juntos, tornaram mais leve meu trabalho. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias. Foi bom poder contar com vocês!

As médicas Dra Izabel e Dra Marileia, que de forma direta ou indireta, me ajudaram neste trabalho, Agradeço muito a vocês não só pela ajuda profissional, mas pela ajuda pessoal, pois foram minhas amigas em um ambiente que não era o meu. Obrigada de verdade!

Aos Professores da banca meu agradecimento pela disponibilidade de estarem presentes, me guiando de forma direta e indireta na elaboração desse trabalho.

Aos funcionários da Pós-graduação, especialmente à Profa. Manuela, Margarete, aos estagiários e à Silvana, pela disponibilidade, simpatia e gentileza. Obrigada pela ajuda!

Aos pacientes pela delicadeza e sensibilidade no compartilhamento desse meu aprendizado.

Aos professores atuantes do POSPAT que fizeram diferença na minha caminhada e aprendizado.

À Capes, pela bolsa de estudos.

Ninguém vence sozinho... Obrigada a todos!

RESUMO

O câncer de colo uterino é o terceiro câncer mais comum em mulheres. A infecção e persistência do papilomavirus humano (HPV) tem papel fundamental no surgimento e evolução das lesões cervicais, promovendo alterações no ciclo celular e proliferação celular descontrolada através das oncoproteínas E6 e E7. Entretanto, fazem-se necessários diversos outros fatores para o desenvolvimento de neoplasias. Entre estes, encontram-se as metaloproteinases de matriz (MMP), endopeptidases capazes de digerir matriz extracelular, membrana basal e induzir fatores de crescimento, que participam dos processos de invasão, metástase, angiogênese e recidiva tumorais. Em lesões neoplásicas, a síntese de MMPs encontra-se aumentada. Sua atividade normalmente é contrarregulada por inibidores endógenos, sendo muito comum que haja desequilíbrio nesta relação em lesões tumorais. Apesar de muito estudo sobre sua relação com o câncer cervical, sabe-se pouco sobre o papel das MMPs e seus inibidores na progressão de lesões cervicais causadas por HPV. Este estudo procura correlacionar a expressão de TIMP2 e RECK às lesões cervicais causadas por HPV. Foram utilizadas 115 amostras teciduais, obtidas por conização de lesões cervicais uterinas entre 2011 e 2015 no Hospital das Clínicas de Recife, nas quais foi realizado estudo histopatológico e imunohistoquímico. Foi observada reatividade fraca no citoplasma de células do tecido escamoso de 28,5% dos controles, sem nenhuma lâmina demonstrar reatividade moderada ou forte. Quanto ao núcleo, a quase totalidade das amostras não apresentou TIMP-2, enquanto 28,5% dos controles o fez. No epitélio glandular nenhuma amostra do Grupo Controle, NIC I ou NIC II foi positiva para TIMP2 no citoplasma e núcleo. Das amostras de NIC III, 6% demonstraram positividade no citoplasma. Os resultados de RECK no citoplasma do epitélio escamoso mostraram que a expressão de RECK no citoplasma de células epiteliais escamosas é significativamente maior quanto maior o grau de lesão do tecido, exceto no CC, onde a expressão é menor que a das lesões NIC III ($p = 0,019$). Os resultados demonstraram que a expressão nuclear de RECK em células epiteliais escamosas é significativamente menor nos tecidos displásicos ($p < 0,001$). Nas análises de citoplasma do epitélio glandular, nenhuma amostra do Grupo Controle, NIC I e NIC II foi positiva, havendo 3,6% de positividade nas lesões de NIC III, todas com reatividade fraca ou moderada, e 10% de positividade moderada nas amostras de CC. Nenhuma das amostras apresentou positividade nuclear. Os resultados obtidos demonstram menor expressão nuclear de TIMP2 e RECK na presença de displasia e maior expressão citoplasmática de RECK nas células escamosas. Esta foi maior quanto mais alto o grau de displasia, mas foi menor nas amostras de carcinoma do que nas de NIC III. Conclui-se que os inibidores de MMPs podem ter utilidade como marcadores imunohistológicos nas lesões cervicais, sendo necessários mais estudos para sua validação prática.

Palavras chave: Papillomavírus Humano. Displasia do Colo do Útero. Metaloproteinases da Matriz. Inibidores Teciduais de Metaloproteinases.

ABSTRACT

Cervical cancer is the third most common cancer in women. The infection and persistence of human papillomavirus (HPV) plays a key role in the emergence and evolution of cervical lesions, promoting changes in the cell cycle and uncontrolled cell proliferation through the oncoproteins E6 and E7. However, make up several other factors required for the development of malignancies. Among these are the matrix metalloproteinases (MMPs), endopeptidases capable of digesting the extracellular matrix, basement membrane and induce growth factors, that participate in the processes of invasion, metastasis, angiogenesis and tumor recurrence. In neoplastic lesions, MMPs synthesis is increased. Its activity is usually contrarregulada by endogenous inhibitors, being very common there is imbalance in this relationship in tumor lesions. Despite much study on its relationship with cervical cancer, little is known about the role of MMPs and their inhibitors in the progression of cervical lesions caused by HPV. This study tries to correlate the expression of RECK and TIMP2 the cervical lesions caused by HPV. 115 tissue samples were used, obtained by conization to uterine cervical lesions between 2011 and 2015 at the Hospital das Clinicas of Recife, in which was conducted histopathological and immunohistochemical study. Weak reactivity was observed in the cytoplasm of the squamous tissue cells of 28.5% of controls, with no slide show moderate or strong reactivity. As for the core, almost all of the samples showed no TIMP-2, while 28.5% of controls did. Glandular epithelium in any sample of the control group, CIN I or CIN II was positive for TIMP2 in the cytoplasm and nucleus. Samples of CIN III, 6% showed positivity in the cytoplasm. The results of RECK in the cytoplasm of squamous epithelium showed that RECK expression in the cytoplasm of squamous epithelial cells is significantly higher the higher the degree of tissue injury, except DC, where expression is lower than that of CIN III lesions ($p = 0.019$). The results showed that nuclear RECK expression in squamous epithelial cells is significantly lower in dysplastic tissues ($p < 0.001$). In the cytoplasm analysis of glandular epithelium, no sample of the control group, CIN I and CIN II was positive, with 3.6% of positivity in CIN III lesions, all with low or moderate reactivity, and 10% moderate positivity in the samples DC. None of the samples showed nuclear positivity. The results showed lower nuclear expression TIMP2 and RECK in the presence of dysplasia and increased cytoplasmic expression of RECK in squamous cells. This was greater the higher the degree of dysplasia, but was lower in carcinoma samples than in CIN III. We conclude that MMP inhibitors may have utility as immunohistological markers in cervical lesions, more research is needed to validate your practice.

Keywords: Human Papillomavirus. Cervical dysplasia. Matrix metalloproteinases. Tissue Inhibitors of Metalloproteinases.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fisiopatologia da infecção epitelial por HPV17
- Figura 2** - Esquema que representa o equilíbrio e desequilíbrio das Metaloproteinases (MMPs) e dos inibidores tissulares de metaloproteinases (TIMPs)25
- Figura 3** - Expressão de Metaloproteinases (MMPs) e de inibidores tissulares das metaloproteinases (TIMPs) em células tumorais na mama26
- Figura 4** - Expressão das Metaloproteinases (MMPs) no câncer28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Expressão imunohistoquímica de TIMP-2 no citoplasma e núcleo das células epiteliais escamosas da cérvix uterina.....41

Tabela 2 - Expressão imunohistoquímica de TIMP-2 no citoplasma e núcleo das células epiteliais glandulares da cérvix uterina na presença de células escamosas displásicas.....42

Tabela 3 - Expressão imunohistoquímica de RECK no citoplasma e núcleo das células epiteliais escamosas da cérvix uterina.....43

Tabela 4 - Expressão imunohistoquímica de RECK no citoplasma e núcleo das células epiteliais glandulares da cérvix uterina na presença de células escamosas displásicas.....44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC-US Atipia Escamosa de Significado Indeterminado

CC Câncer Cervical

CDK *Cyclin Dependent Kinases*

DNA Ácido Desoxiribonucleico

E2F Fator de Transcrição E2F

E2 Proteína Viral Precoce 2

E4 Proteína Viral Precoce 4

E5 Proteína Viral Precoce 5

E6 Proteína Viral Precoce 6

E7 Proteína Viral Precoce 7

HPV Papiloma Vírus humano

HSIL Lesão Intra-epitelial de Alto grau

INCA Instituto Nacional de Câncer

IVA inspeção visual com ácido acético

LCR Long Control Region

LSIL Lesão Intra-epitelial de Baixo Grau

MEC Matriz Extracelular

MET Transição mesenquimal

MMPIs Inibidores farmacêuticos de Metaloproteinases

MMPs Metaloproteinases

NIC Neoplasia intraepitelial cervical

RECK Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs

TIMP Inibidores de tissulares de metaloproteinases

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 O Papilomavirus Humano.....	17
2.2 Ciclo Biológico do HPV.....	19
2.3 HPV e carcinogênese.....	21
2.4 Metaloproteinases de matriz e seus inibidores.....	22
2.5 Inibidores das Metaloproteinases (TIMP-2 e RECK).....	24
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 METODOLOGIA	30
4.1 Grupo deEstudos.....	30
4.2 Aspectos Éticos.....	30
4.3 Imunohistoquímica para TIMP-2 e RECK.....	30
4.4 Análise Estatística	31
5 Artigo original “ESTUDO IMUNOHISTOQUIMICO DA EXPRESSÃO DE INIBIDORES DE METALOPROTEINASES DA MATRIZ TIMP-2 E RECK NAS LESÕES E CÂNCER CERVICAL”.....	32
6 Conclusão.....	45
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXOS.....	57
ANEXO A- PARECER DO CEP.....	57

1 APRESENTAÇÃO

O câncer do colo uterino é o quarto tipo de câncer mundialmente mais comum entre as mulheres e o sétimo tipo mais comum relacionado a todos os tipos cânceres. A ocorrência de CC foi estimada em 528.000 casos novos a cada ano, e foi a causa de 266.000 óbitos em 2012 (FERLAY et al., 2013). No Brasil, esta neoplasia é a terceira mais frequente em mulheres (INCA, 2014).

O câncer cervical apresenta, na maioria dos casos uma evolução lenta e sua prevenção consiste em identificar o mais precocemente possível as lesões atípicas no epitélio do colo uterino por meio de exames como a inspeção visual com ácido acético (IVA), cervicografia, colposcopia, e pesquisa de alterações celulares pelos métodos de Papanicolaou, de histopatologia e métodos de biologia molecular que identificam a presença de DNA viral nos tecidos (BEZERRA et al, 2005).

Evidências epidemiológicas comprovaram que a infecção pelo Papillomavírus humano (HPV) é causa necessária, mas não suficiente, para a ocorrência do câncer do colo do útero (AYRES; SILVA, 2010). São necessários fatores, tais como: alta paridade, uso prolongado de contraceptivos orais, estado nutricional, infecção por Chlamydia, polimorfismo viral e tabagismo. (RAMA et al, 2008).

Estudos demonstram que o alto número de partos é um fator consistente para o desenvolvimento do câncer cervical em mulheres que possuem o DNA do HPV. O risco de desenvolvimento dessa neoplasia dobra nas que tiveram 4 filhos, quando comparado àquelas que tiveram um ou nenhum filho (BOSCH et al, 2002).

Os estudos tem comprovado que a integração do genoma de determinados tipos de HPV (principalmente os do tipo 16, 18, 31, 33 e 35, dentre outras centenas identificadas), com o genoma da célula hospedeira, estão associados à formação de lesões pré-neoplásicas (QUEIROZ; PESSOA; SOUSA, 2005).

O HPV surgiu como principal agente etiológico suspeito ao ser encontrado em cerca de 90% dos cânceres cervicais e por possuir oncogenes (E6 e E7) com potencial de transformação (RIVOIRE et al, 2006).

Todos os tipos de HPV são replicados exclusivamente no núcleo da célula hospedeira. Em lesões de pele benignas, associadas ao HPV, o genoma viral encontra-se separado do DNA celular e surge como um plasmídeo extra-cromossômico (corpo epissomal). Em lesões malignas associadas aos HPV 16 e 18, contudo, o DNA viral inicialmente se apresenta na

forma episomal e progride para interação dos genes E6 e E7 no genoma do hospedeiro (RIVOIRE et al, 2006).

A fase invasiva do câncer cervical é precedida pelas NICs (Neoplasia Intraepitelial Cervical), representada pelas siglas NIC I, NIC II e NIC III e associadas com as infecções pelo HPV, sendo que esta classificação apresenta diferentes graus de lesões na progressão (CARVALHO; QUEIROZ, 2011).

Estima-se que pelo menos 50% dos indivíduos sexualmente ativos irão adquirir algum tipo de HPV durante a vida, e que 80% das mulheres entrarão em contato com algum HPV até os 50 anos de idade. Na maioria dos indivíduos, as infecções por HPV são assintomáticas e transitórias; 70% das infecções novas regredem em até um ano, e do restante, cerca de 90% em dois anos (FEDRIZZI et al, 2008).

É necessária atenção aos fatos que permeiam a influência na aquisição desta doença, pois estudos apontam que fatores como baixa escolaridade e baixa condição socioeconômica contribuem para a não adesão ao tratamento das lesões precursoras e,consequentemente, para o aumento da incidência da doença (CARVALHO; QUEIROZ, 2011).

É estimado que uma redução de cerca de 80% da mortalidade por este câncer pode ser alcançada através do rastreamento de lesões precursoras com alto potencial de malignidade ou carcinoma *in situ* em mulheres na faixa etária de 25 a 65 anos com o teste de Papanicolau e tratamento das lesões. Para tanto é necessário garantir a organização, integralidade e a qualidade do programa de rastreamento, bem como o seguimento das pacientes (INCA, 2011).

Desta forma, o presente trabalho propôs estudar a possível associação entre os graus de lesões cervicais intraepiteliais e invasivas e a expressão dos inibidores de MMPs TIMP-2 e RECK.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O Papilomavirus Humano

Os papilomavirus são pequenos vírus de 52 a 55nm de diâmetro, cuja cápsula organiza 72 capsômeros em simetria icosaédrica. O genoma viral é constituído por um DNA circular de dupla hélice de aproximadamente 8000 pares de bases e está dividido em uma região codificante com oito fases de leitura aberta (ORF) que codificam as proteínas precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e as proteínas tardias (L1 e L2), e outra região não codificante chamada LCR (long control region), implicada no controle da replicação do DNA viral e no controle da transcrição dos genes virais (ZUR HAUSEN, 1999).

Após a transmissão, os HPV infectam as células basais (células tronco) na junção escamo-colunar ou através de micro traumas presentes na ectocérvice (Figura 1). O DNA viral é transportado para o núcleo seguindo a rede proteica do citoesqueleto (microtúbulos) após o desnudamento do capsídeo (ZUR HAUSEN, 1996).

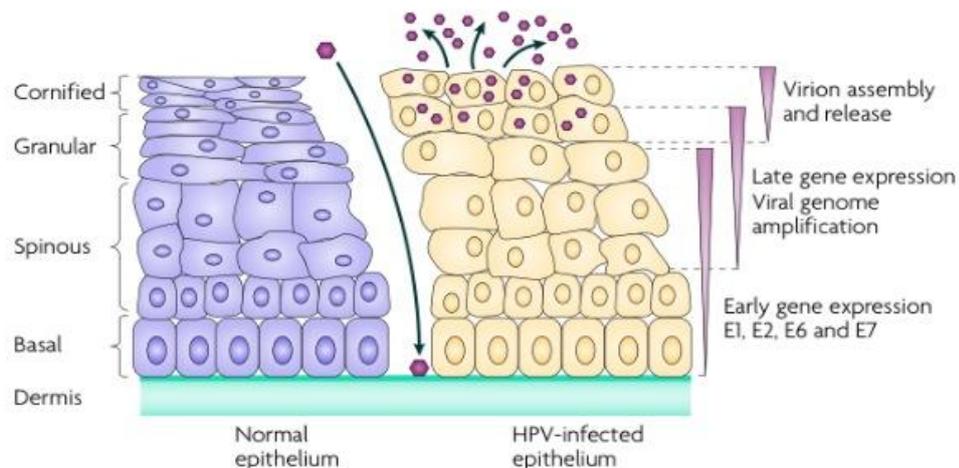


Figura 1 – Fisiopatologia da infecção epitelial por HPV. Os papilomavírus humanos (HPV) infectam queratinócitos na camada basal do epitélio que fica exposto através de microtraumas. Epitélio não infectado é mostrado no lado esquerdo e o epitélio infectado por HPV está à direita. Na infecção, os genomas virais são estabelecidos no núcleo como epissomas, baixo número de cópias e genes virais são inicialmente expressos. O genoma viral é replicado em sincronia com a replicação do DNA do hospedeiro.

Fonte: Adaptado de Moody e Laimins, 2010.

A relação entre câncer cervical e infecção pelo Papilomavirus Humano (HPV) está bem estabelecida e o DNA do HPV é detectado na maioria das amostras histológicas de cânceres invasivos (97,9 a 99,7%). Sabe-se que para a infecção pelo HPV evoluir para o

câncer invasivo é necessária à persistência do vírus e sua integração ao genoma do hospedeiro (ZUR HAUSEN, 1996; BOSCH et al, 2002).

Mais de 150 tipos de HPVs já foram descritos e cerca de 40 cepas infectam o trato ano-genital. Esses tipos virais têm sido classificados de acordo com propensão das células infectadas à progressão maligna (BONNANS; CHOU; WERB, 2014) . São classificados segundo Zur Hausen (2002) e Muñoz e colaboradores (2003):

-HPV de baixo risco ou não oncogênicos: 6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89, geralmente encontrados nas lesões verrucosas e condilomatosas e de baixo grau;

-HPV de alto risco oncogênico: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82, encontrados nas lesões de alto grau e invasão;

-HPV provavelmente de alto risco: 26, 53, 66, 68, 73 e 82;

-HPV de risco indeterminado: 2, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 55, 57, 62, 67, 69, 71, 74, 77, 83, 84, 85, 86, 87, 90 e 91.

Aproximadamente 73% dos cânceres estão associados aos HPV 16 e 18 e cerca de 90% dos condilomas aos HPV 6 e 11 (ZUR HAUSEN, 1996) .

A maioria dos cânceres do colo uterino no mundo são causados pelos HPV-16 (57%), 18 (16%), 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 (LI et al, 2011). O HPV-16 é o mais frequente em quase todo mundo, exceto na Indonésia com o HPV-18 (MUÑOZ et al, 2003; ZUR HAUSEN, 2002).

Fatores relacionados ao vírus, como o genótipo, presença de mais de um tipo viral oncogênico (associações) e, ao hospedeiro, tais como: imunossupressão, tabagismo, infecção com outras doenças sexualmente transmissíveis, deficiências nutricionais e uso de anticoncepcional oral, tem sido relacionadas com a persistência da infecção, o que representa o fator central de progressões (FREITAS et al, 2012).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado os HPVs de alto risco como fator primário para o desenvolvimento do câncer do colo e estudos prospectivos e caso-controle indicam que a persistência da infecção por HPV é o fator de risco mais significativo para esse tipo de neoplasia (ZUR HAUSEN, 2002; STEBEN; DUARTE-FRANCO, 2007).

A infecção duradoura por HPVs de alto risco, após dois anos, especialmente para os tipos 16 e 18, tem como consequência a superexpressão de genes virais transformantes E6 e E7, cujos produtos proteicos têm como particularidade interferir na regulação do ciclo celular, ocasionando instabilidade genômica nas células infectadas. Se não houver intervenção neste estágio, haverá integração do DNA viral ao DNA das células infectadas iniciando-se a

transformação carcinogênica depois de um tempo estimado em 15 a 20 anos (ZUR HAUSEN, 2002; PITTAYAKHAJONWUT; ANGELETTI, 2010).

A literatura nos últimos 25 anos vem reafirmando que a presença do HPV é indispensável para a iniciação e promoção das lesões cervicais, mas muitas mulheres portadoras do vírus, mesmo dos tipos oncogênicos, não desenvolvem doença ou desenvolvem lesões que regridem ou se estabilizam em estágios pré- invasivos (HO et al, 1998; ZUR HAUSEN, 1999; STEBEN; DUARTE-FRANCO,2007) e essa afirmação cria vieses necessário de pesquisas e esclarecimento.

2.2 Ciclo biológico do HPV

O ciclo celular pode ser conceituado como uma cadeia de eventos que leva à proliferação celular por mitose. A divisão celular nos seres eucariontes compreende quatro fases: G1, S, G2 e M. Células quiescentes encontram-se em uma condição denominada G0. A fase G1 é considerada uma fase pré-sintética, na qual a célula inicia a ativação de uma série de genes, incluindo proto-oncogenes e genes necessários à síntese de ribossomos e tradução de proteínas. A fase S compreende o período da duplicação do DNA. O período G2 é o intervalo entre o final da síntese e o início da mitose propriamente dita da célula em questão, sendo por essa razão denominada fase pré-mitótica. Na fase M ocorre a divisão do núcleo seguida da citocinese (FERRAZ et al, 2012).

Várias proteínas inibidoras podem parar o avanço deste ciclo. Entre elas p15 e p16, que atuam bloqueando componentes essenciais para progressão do ciclo celular, como CDK (cyclin-dependent kinases) e ciclinas, impedindo o avanço do ciclo da fase G1 para S. Outros inibidores são p21 (que é associado ao proto-oncogene ras) e p53, que monitoram a saúde celular, a integridade de seus cromossomos e a execução correta das diferentes fases do ciclo (RIVOIRE et al, 2001).

O ciclo viral é extremamente dependente da diferenciação dos queratinócitos. Para que ocorra a execução correta do ciclo, as proteínas E6 e E7 são expressas em uma taxa muito baixa por serem inibidas pela proteína E2. Quando, em situação adversa à sua história natural, há uma quebra do genoma viral nas regiões E1 e E2, que resulta numa desregulação dos genes E6 e E7 com superexpressão, que por serem proteínas que atuam em genes responsáveis pela apoptose e supressores de tumor atuam “freando” o crescimento celular, resultando em instabilidade cromossômica, aneuploidia e modificações no DNA da célula infectada,

havendo na sequência, a integração do DNA viral ao DNA celular iniciando a transformação neoplásica (ZUR HAUSEN, 2002).

A proteína p16^{INK4A}, inibidora de quinase 4, é uma reguladora da divisão celular, superexpressa pela presença da oncoproteína E7, codificada pelo gene E7 HPV, a sua expressão é observada em núcleos e citoplasmas de células displásicas do epitélio escamoso, assim como em carcinomas. Estudos mostram que a superexpressão da proteína p16^{INK4A} pode ser utilizada para estimar a evolução e extensão da lesão (RAJCÁNI et al, 2009; BERGERON et al, 2010; MISSAOUI et al, 2010).

É justamente a perda da capacidade de completar o ciclo 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 NIC de grau maior e do câncer cervical está associado com a perda da regulação deste ciclo reprodutivo do HPV (DOORBAR, 2005).

O potencial oncogênico do HPV está relacionado aos produtos dos genes E6 e E7, que interagem com uma variedade de proteínas reguladoras do ciclo celular codificadas por genes supressores de tumor (FERRAZ et al, 2012).

A proteína E7 inibe a atividade da pRB, que tem papel fundamental na manutenção da célula em G1, exercendo sua função por formar complexos estáveis com o fator de transcrição E2F, que uma vez livre, desencadeia o processo de replicação do DNA. A inativação da pRB aumenta a proliferação celular no epitélio infectado, o que pode ser diretamente demonstrado através da detecção do antígeno nuclear associado à proliferação (FERRAZ et al, 2012).

A proteína E7 do HPV também é capaz de se ligar à p21 e p27, ambas inibidores de quinases dependentes de ciclina, o que impede o controle do ciclo celular em diversos pontos de checagem. O HPV pode interferir no controle do ciclo celular e apoptose por meio dos produtos da oncoproteína E6, a qual se liga à p53, marcando-a para degradação pelo proteassomo (MOODY; LAIMINS, 2010; DINGJUN; MEI; WEI, 2015).

A degradação da p53 compromete a integridade do DNA replicado, causando instabilidade cromossomal, imortalização e proliferação anormal das células transformadas, favorecendo o desenvolvimento do tumor (MOODY; LAIMINS, 2010).

A infecção é controlada por mecanismos que não foram ainda perfeitamente elucidados. A eliminação viral é feita entre 8 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. Uma infecção por HPV de alto risco resulta em progressão para câncer cervical apenas em uma pequena percentagem de mulheres após um longo período de latência (ZUR HAUSEN, 1996; HO et al, 1998).

2.3 HPV e carcinogênese

Os estudos sugerem que as infecções pelos tipos oncogênicos do HPV 16 e 18 desempenham um papel importante na gênese das lesões pré-cancerosas, sendo o vírus necessário, porém, não suficiente para desencadear a carcinogênese. Essa correlação entre tipos de HPV de alto risco, câncer cervical e suas lesões precursoras ficou comprovada após os estudos com metodologia molecular, onde se identificou o DNA de HPV de alto risco em 84 a 99,7% dos cânceres cervicais. Essa variação depende da metodologia empregada bem como da população estudada (ITO et al,2010).

Não está claro ainda porque apenas um pequeno percentual de mulheres infectadas pelo HPV desenvolvem lesões pré-malignas que podem evoluir ou não para invasão. A integração viral, situação necessária para a transformação maligna das células tornando-as imortalizadas, não acontece em todos os casos e o genoma viral é mantido em sua forma episomal. 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).

É possível, contudo, que diferentes mecanismos sejam utilizados pelos diferentes subtipos para induzir transformação neoplásica. Todos os tipos de HPV são replicados exclusivamente no núcleo da célula hospedeira. Em lesões de pele benignas, associadas ao HPV, o genoma viral encontra-se separado do DNA celular e surge como um plasmídeo extra-cromossômico (corpo episomal). Em lesões malignas associadas aos HPV 16 e 18, contudo, parte do DNA viral (genes E6 e E7) que integram ao genoma do hospedeiro.

Para que os genes E6 e E7 se integrem ao genoma da célula hospedeira, é necessário que haja uma quebra no genoma viral. Esta separação não ocorre de forma aleatória, pois a maioria ocorre nas regiões E1 e E2 do vírus. O resultado dessa quebra é uma perda de função desses dois genes, acompanhada de uma desregulação dos genes E6 e E7, resultando em transformação da célula hospedeira (RIVOIRE et al, 2006).

Sabe-se que a integração viral é uma etapa chave para a carcinogênese cervical devido às alterações do ciclo celular produzidas pela inibição de genes supressores de tumor nas

células do hospedeiro e pela superexpressão dos genes virais E6 e E7. É a expressão contínua e concomitante desses dois genes que está na origem da imortalização das células infectadas, o qual pode ser constatado através da detecção de RNAm de E6 e E7 em lesões de alto grau e carcinoma cervical (MÜNGER; HOWLEY, 2002; CATTANI, 2009).

Mulheres com 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 e classificados através da nomenclatura: Neoplasia Intraepitelial cervical 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 *in situ*; carcinoma escamoso e adenocarcinoma *in situ* e invasor (SILVA NETO, 2012).

2.4 Metaloproteinases de matriz

A Matriz Extracelular (MEC) é definida como uma mistura heterogênea de macromoléculas (incluindo colágenos e glicoproteínas não-colagênicas, fibras elásticas e proteoglicanos) capaz de se automodelar propiciando suporte mecânico para células e tecidos. A MEC deixou de ser vista apenas como suporte mecânico, mas também como fonte de informações e como reservatório de fatores de crescimento que atuam cooperativamente para regular a ampla variedade de processos celulares, de tamanha importância que a perda de função de muitas de suas proteínas causa morte embrionária (RAMIREZ; RIFKIN, 2003; BONNANS; CHOU; WERB, 2014).

Em manifestações menos drásticas, o remodelamento aberrante da MEC pode causar diversas doenças. Dentre estas doenças podemos enfatizar as cardiomiopatias, secundárias à degradação excessiva da MEC; osteoartrite pela superexpressão de metaloproteinases, ou, curiosamente, perda de função de MMP2; neoplasias, pois a MEC é responsável pela manutenção da arquitetura e polarização adequada do tecido; e fibrose, quando há excesso de produção de MEC. A fibrose pode aumentar o risco para alguns cânceres, como o carcinoma hepatocelular (BONNANS; CHOU; WERB, 2014).

As MMPs são enzimas-chave que regulam uma grande variedade de processos fisiológicos e eventos de sinalização, tornando-se moléculas fundamentais na comunicação entre o tumor e o estroma, pois são responsáveis pela degradação da MEC, exercendo, desta maneira, um papel essencial no desenvolvimento, progressão e, principalmente, disseminação

de malignidades humanas. No câncer, a regulação alterada da proteólise favorece a degradação da MEC (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010; DINGJUN; MEI; WEI, 2015).

Entretanto, algumas destas MMPs podem exercer efeito antineoplásico dependendo de seus substratos, visto que podem interferir no crescimento tumoral, angiogênese e resposta imune. Isto ocorre porque além das proteínas da MEC, as MMPs podem clivar diversas substâncias, como receptores de superfície, adesinas, fatores de coagulação e outras proteinases. Esta variedade de funções, assim como diversos outros vieses, dificulta muito o uso clínico de MMPs no tratamento do câncer (VANDENBROUCKE; LIBERT, 2014).

As MMPs compreendem um grupo de enzimas proteolíticas dependentes de Zn^{2+} (endopeptidases) que, de acordo com a especificidade do substrato, foram historicamente subdivididas em collagenases, gelatinases, elastases, estromelinas. Atualmente, as 23 MMPs conhecidas expressas em humanos são classificadas de acordo com sua estrutura (EGEBLAD; WERB, 2002).

A estrutura das MMPs é conservada em diversos mamíferos, sendo compostas por um domínio catalítico e um pró-domínio auto-inibitório. A inibição é causada por um resíduo Cys que interage com o Zn^{2+} do sítio ativo, inibindo a catálise. Para que haja reação, é necessário que o pró-domínio seja removido ou inibido. Além destes, no terminal C há um domínio hemopexina, que promove a interação da MMP com outras proteínas, membranas e substratos (PAGE-McCAW; EWALD; WERB, 2007).

AS MMPs são integrantes fundamentais no processo de progressão das lesões tumorais. Baseado em seus substratos, as MMPs tem sido divididas em subclasses distintas: collagenases (MMP-1, 8 e 13), gelatinases (MMP-2 e 9), estromelinas (MMP-3, 7 e 10), matrilisinas (MMP-7 e 26) e tipo membrana (MMP-14, 15, 16, 17 e 24) (ROY; YANG; MOSES, 2009).

Segundo Dingjun e colaboradores (2015), as MMPs mais presentes nos carcinomas cervicais invasivos são as MMP-2, 7, 9 e 10, sendo que apenas as MMP-2 e -9 estão comprovadamente associadas a um mau prognóstico.

A infecção pelo HPV de alto risco e sua persistência são condições necessárias para o desenvolvimento de câncer de colo uterino, entretanto nem todas as mulheres infectadas progridem para invasão, haja vista a necessidade de cofatores. A progressão desses tumores é caracterizada pelo aumento da secreção e ativação das MMPs produzidas pelas próprias

células do tumor ou estromais, tais como os fibroblastos e macrófagos (STETLER; STEVERNSON, 2008).

2.5 Inibidores das Metaloproteinases (TIMP-2 e RECK)

As atividades das MMPs são especificamente inibidas pelos TIMPs (Inibidores de tissulares de metaloproteinases), constituído por um grupo de quatro tipos: TIMP-1, 2, 3 e 4 (ROY; YANG; MOSES, 2009). Todos, exceto o TIMP-3, que está sequestrado na MEC, são proteínas solúveis. A razão entre MMPs e TIMPs quantifica a taxa de atividade proteolítica em determinado tecido (BONNANS; CHOU; WERB, 2014). Estruturalmente, eles apresentam três pontes dissulfeto em cada terminal, de forma que o terminal N enovela-se sobre si e liga-se ao sítio ativo das MMPs, promovendo uma inibição reversível (VANDENBROUCKE; LIBERT, 2014).

Sabe-se que na invasão neoplásica, além da degradação da matriz extracelular 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. Também incluem as moléculas não-matriz extracelular, variando de precursores de fatores de desenvolvimento a moléculas de adesão de superfície celular, precursores angiogênicos e MET (transição mesenquimal), processo de perda de polaridade das células epiteliais e adesão célula-célula com ganho da capacidade de migração e propriedades invasivas tornando-se células mesenquimais observado em metástases iniciais para a progressão tumoral (ROY; YANG; MOSES, 2009).

Outros estudos, porém, demonstraram que uma grande quantidade de MMPs é constitutivamente expressa em várias linhagens celulares tumorais na ausência de qualquer componente do estroma (SCHRÖPFER et al, 2010).

Discute-se desde então a participação de um possível agente inibidor, capaz de modular a atividade das referidas enzimas. Estes inibidores naturais, agora reconhecidos como TIMPs (Tissue Inhibitors of Proteases) assumem um papel primordial na expressão das MMPs (FERRAZ et al, 2010) (Figura 2).

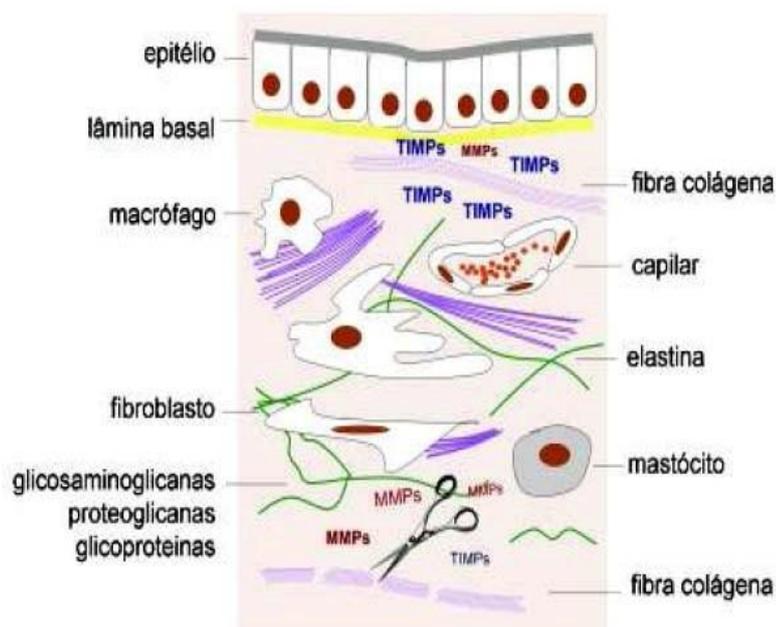


Figura 2. O processo de remodelação e regeneração dos tecidos é controlado por mecanismos enzimáticos presentes no tecido conectivo, que trabalham em favor da degradação harmônica da matriz extracelular nos diversos eventos fisiológicos. A perda deste equilíbrio ou modulação é deletéria para a estabilidade estrutural e mecânica dos tecidos, desregulando suas funções e levando ao surgimento dos processos de doença. Os inibidores teciduais das metaloproteínas (TIMPs) são imprescindíveis para a manutenção deste equilíbrio. Na parte inferior da figura é representada a clivagem do colágeno como resultado da maior expressão das MMPs. **Adaptado de Bruce A, et al., 2008**

Os TIMPs são responsáveis por efeitos contrários à progressão neoplásica, ou seja, seu aumento está relacionado ao comprometimento da ação das MMPs, assim como o RECK (*Reversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs*), pode regular MMP-2, -9 e MT1-MMP, por exemplo. Estudos têm constatado diminuição do RECK em cânceres pancreático, mamário, de pulmão, próstata, colorretal e hepatocarcinoma (DONG et al, 2010). Outras análises associam os aumentos da RECK e MMPIs em geral com a diminuição da invasividade, potencial metastático e melhor prognóstico (BONNANS; CHOU; WERB, 2014). A proteína RECK também foi identificada como capaz de regular negativamente MMP-2, 9 e 14 (DONG et al, 2010; FURUMOTO et al, 2001; OH et al, 2001).

Os TIMPs (1, 2, 3 e 4) inibem reversivelmente as MMPs em proporção molar estequiométrica de 1:1 e diferem na expressão tecidual específica e capacidade para inibir várias MMPs (EGEBLAD E WERB, 2002). TIMP 1 e 3 são glicoproteínas, enquanto que TIMP-2 e 4 não são glicosilados (LECO et al, 1994). TIMP 1, 2 e 4 são secretados e TIMP-3 está ancorado na MEC (YADAV et al, 2014). Embora haja uma preferência de ligação do TIMP-2 pela MMP-2 e do TIMP-1 pela MMP-9, os TIMPs em geral não apresentam maior

grau de especificidade por alguma MMP em particular (SCHULZ, 2007). Ao se ligarem às MMPs, os TIMPs bloqueiam o sítio ativo, impedindo o acesso ao substrato específico. Esta inibição ocorre através da ligação entre o domínio N-terminal e resíduos de valina e cisteína presentes nos TIMPs e o sítio catalítico das MMPs, quelando o átomo de zinco (MURPHY; NAGASE, 2008).

As MMPs e seus inibidores podem ser localizados no soro e nos tecidos tornando assim possível sua detecção, quantificação e monitoramento. Estudo com tumores de colo do útero identificou MMP-2 em um terço das células neoplásicas e estromais. Em metade das amostras desses casos TIMP-2 também foi identificado em ambos os tipos celulares, bem como MT1-MMP (VALDIVIA et al, 2011).

Atualmente, entende-se que as MMPs não participam apenas nas fases tardias da carcinogênese, mas também estão envolvidas nos estágios iniciais, desempenhando importante papel na manutenção do microambiente tumoral. Portanto, uma consideração minuciosa acerca da expressão e funções das várias MMPs em diferentes tipos e fases dos tumores é necessária para o desenvolvimento de terapias promissoras através de inibidores (YADAV et al, 2014). Isto é evidenciado pela grande variedade de TIMPs e MMPs expressas em diferentes tipos de células dentro e fora de uma neoplasia, conforme demonstrado na figura 3.

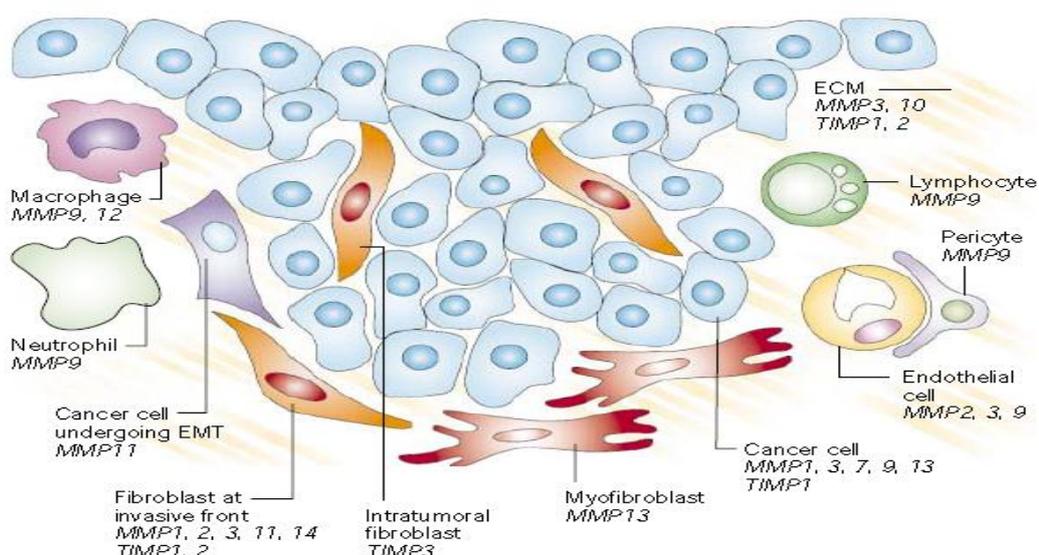


Figura 3 – Expressão de MMPs e TIMPs em células tumorais e peritumorais. A rica variedade de MMPs e inibidores nas diferentes células tumorais, estromais e humorais indica que o papel destas moléculas na história natural das neoplasias é complexo, envolvendo muito mais que a simples degradação de MEC.

Fonte: Egeblad e Werb, 2002.

As oncoproteínas virais E6 e E7 do HPV, têm participação nos mecanismos envolvidos na progressão do carcinoma cervical. Cardeal et al. (2012) analisaram o efeito das oncoproteínas do HPV-16 na expressão de MMP-2, MMP-9, MT1-MMP e seus inibidores TIMP-2 e RECK em cultura de queratinócitos, constatando que E7 estava associado ao aumento da atividade da pro-MMP-9, enquanto as oncoproteínas E6 e E7 participavam da diminuição dos níveis de RECK e TIMP-2 também em culturas, resultado corroborado pelos achados de Dingjun et al. (2015). Além das oncoproteínas E6 e E7, Akgül et al. (2011) observaram que a proteína E2 do HPV-18 eleva a expressão de MMP-9 .

Com base na importância dessas proteases para a invasão e metástase, inibidores farmacêuticos de MMPs foram desenvolvidos, porém, os resultados dos ensaios clínicos com estas drogas mostraram-se desapontadores. Uma das explicações é o fato dos inibidores terem sido administrados em pacientes com cânceres em estágios tardios, com suprimento sanguíneo estabelecido. Além disso, há uma grande diversidade de MMPs, com diferentes substratos e funções, podendo também haver redundância e atuar tanto de maneira favorável como desfavorável à progressão tumoral. Dessa forma, a perda de seletividade de MMPs específicas através do uso de doses máximas toleradas de inibidores, bem como ineficiência de doses reduzidas para evitar efeitos colaterais adversos também podem ter contribuído para o insucesso dos ensaios com inibidores da metaloproteinases (EGEBLAD; WERB, 2002).

A degradação proteolítica da MEC pelas MMPs, portanto, mais do que causar uma simples destruição de barreiras mecânicas, leva à interação das células tumorais com diversos fatores que sinalizam para vias reguladoras de eventos celulares relevantes para a biologia do câncer. Estes incluem crescimento de células cancerosas, diferenciação, apoptose, migração e invasão, angiogênese tumoral (Figura 4). A expressão e ativação das MMPs está aumentada em quase todos cânceres humanos em comparação com o tecido normal (EGEBLAD; WERB, 2002).

A expressão tecidual dos TIMPs durante a progressão neoplásica é conflitante entre os estudos. Branca et al. (2006) observaram decréscimo gradual da expressão imuno-histoquímica de TIMP-2 com o aumento do grau de lesões cervicais, sendo esta diminuição acentuada na transição de NIC III para invasão. Sheu et al. (2003), contrariamente, encontrou expressão rara ou ausente de TIMP-1, -2 e -3 nos casos pré-invasivos. Em CCs, TIMP-2 foi detectado em mais da metade dos casos, seguido por TIMP-1 e -3 em menor percentual.

Cardeal et al. (2012) analisou RECK em tecidos cervicais uterinos, onde apresentou expressão imuno-histoquímica diminuída ao longo da progressão das lesões. A maioria dos

casos de cervicite e NIC I analisados apresentaram forte marcação, enquanto metade dos casos de NIC II/III e quase todos os CCs exibiram expressão fraca de RECK.

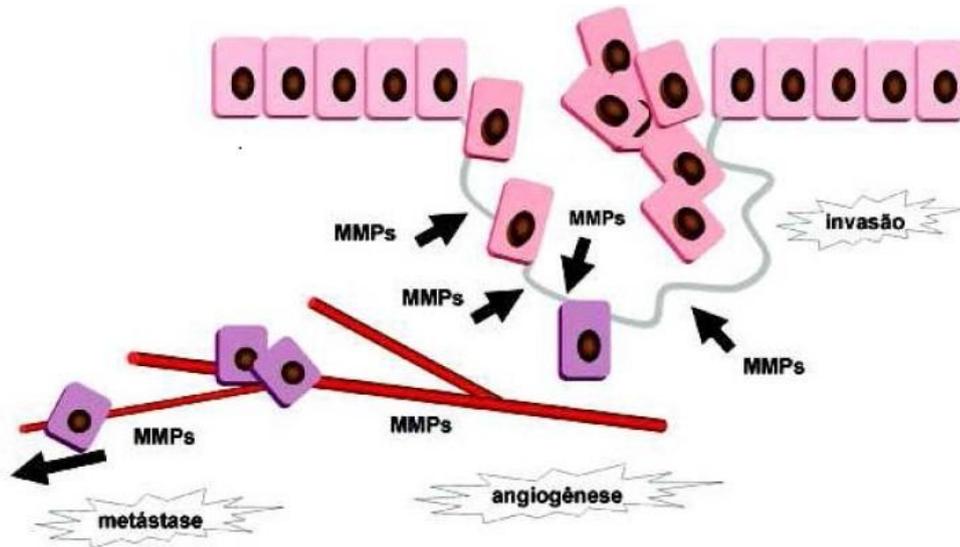


Figura 4 - Expressão das metaloproteinases (MMPs) no câncer, sendo responsável por gerar invasividade local e a distância ao romper a MEC e promover a angiogênese. **Modificado de Rudek, Venitz & Figg, 2002.**

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Correlacionar a expressão de inibidores de metaloproteinases de matriz (TIMP-2 e RECK) com lesões cervicais intraepiteliais e invasivas.

3.2 Objetivos Específicos

- Buscou-se avaliar individualmente a expressão de TIMP-2 e RECK em lesões cervicais;
- Avaliar TIMP-2 e RECK no citoplasma e núcleo de células epiteliais, presente no tecido glandular e escamoso, comparando os grupos.

4 MÉTODOS

4.1 Grupo de estudo

Foram utilizadas 115 amostras de biópsias de lesões cervicais uterinas, arquivadas entre 2011 e 2015 no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas de Recife, Pernambuco, Brasil. Foram avaliadas as fichas de diagnósticos histopatológicos dos casos obtidos através de cirurgia por conização, arquivados no Laboratório de Anatomia Patológica. Foram incluídos os casos positivos para NIC e Câncer Cervical. Foram excluídos os casos para os quais não foi possível localizar o bloco ou lâmina referente para confirmação do diagnóstico. Os casos foram divididos de acordo com o diagnóstico histopatológico, nos seguintes grupos: NIC I (5), NIC II (21), NIC III (57) e CC (10). Os casos para controle (9) foram originados de miomas uterinos. As amostras foram oriundas de tratamento por conização.

4.2 Aspectos éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), através do CAAE nº 17068913.6.0000.5208 (Anexo A), obedecendo integralmente aos princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). As amostras foram obtidas de forma anônima e identificadas por numeração.

4.3 Imunohistoquímica para TIMP2 e RECK

A imunohistoquímica para os inibidores foi realizada utilizando lâminas silanizadas contendo cortes de 4µm de espessura de porções representativas do tumor parafinado. Inicialmente, as amostras foram desparafinadas em xilol e incubadas por 60' em estufa a 60° C. Posteriormente, foram incubadas em xilol II por 30' à temperatura ambiente, seguido de imersão na sequência de álcool etílico 100%, 100%, 100% e 70%, por 5' cada, H2O corrente por 5' e PBS por 5'. Depois, foi realizada a recuperação antigênica na panela de pressão

elétrica contendo tampão citrato pH 6,0. As lâminas sofreram resfriamento a temperatura ambiente e foram, então, imersas em H₂O₂ + metanol (1:1) por 30', H₂O corrente por 5' e PBS 2x5'. Foi realizado bloqueio com PBS-BSA 1% por 1 hora à temperatura ambiente, imersão em PBS 2x5', incubação com anticorpo primário anti-TIMP 2 (SC-21735; 1:300) e anti-RECK (Biorbyt; 1:200) por 2 horas em câmara úmida a 37°C, imersão em PBS 2x5', incubação com anticorpo secundário (ADVANCETM HRP Link; Dako, Glostrup, Denmark) por 20' à temperatura ambiente e imersão em PBS 2x5'. As lâminas foram incubadas com o anticorpo terciário (ADVANCETM HRP Enzyme; Dako, Glostrup, Denmark) por 20' e, depois, com solução cromógena de diaminobenzidina (20 µL Liquid DAB+Chromagen + 1 mL Buffer Substrate; Dako, Glostrup, Denmark) em média por 3'. Em seguida, foram imersas em H₂O destilada por 1', H₂O corrente por 5', contra coradas em hematoxilina de Mayer 5'', imersas em H₂O corrente 5', álcool etílico 70%, 100%, 100% e 100% por 3' cada, xilol I e II por 5' cada, seguido da montagem das lâminas com Entelan.

Baseado no artigo de Brummer et al. (2002), os casos foram analisados semiquantitativamente através da intensidade de reação em mais de 100 células epiteliais e mesenquimais no grupo controle e das lesões cervicais.

Foi considerado o tipo celular (epitelial escamoso e glandular), bem como a posição das reações (núcleo ou citoplasma). Sendo classificados como positivos: fraco (+), moderado (++) e forte (+++) através da intensidade da marcação. Foi usado o seguinte parâmetro de eliminação: marcação pontual (apenas em um espaço pequeno e limitado) não foi considerado, quando a marcação era difusa foi analisada a intensidade da marcação.

4.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software SPSS for Windows v13.0. Foi aplicado o teste Qui-quadrado (χ^2) para associação entre os grupos de variáveis qualitativas ordinais: intensidades da expressão IHQ e graus histopatológicos de lesões cervicais. A significância estatística foi definida em $p < 0,05$.

5. ESTUDO IMUNOHISTOQUIMICO EXPRESSÃO DE INIBIDORES DE METALOPROTEINASES DA MATRIZ TIMP-2 E RECK NAS LESÕES E CÂNCER CERVICAL .

INTRODUÇÃO

A relação entre câncer cervical e infecção pelo Papilomavirus Humano (HPV) está bem estabelecida e o DNA do HPV é detectado na maioria das amostras histológicas de cânceres invasivos (97,9 a 99,7%). Sabe-se que para a infecção pelo HPV evoluir para o câncer invasivo é necessária a persistência do vírus e sua integração ao genoma do hospedeiro.^{1,2}

Aproximadamente 73% dos cânceres estão associados aos HPV 16 e 18 e cerca de 90% dos condilomas aos HPV 6 e 11. A maioria dos cânceres do colo uterino no mundo são causados pelos HPV-16 (57%), 18 (16%), 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59.³ O HPV-16 é o mais frequente em quase todo mundo, exceto na Indonésia com o HPV-18.⁴ O HPV surgiu como principal suspeito ao ser encontrado em cerca de 90% dos cânceres cervicais e por possuir oncogenes (E6 e E7) com potencial de transformação.⁵

Fatores relacionados ao vírus, como o genótipo, presença de mais de um tipo viral oncogênico (associações) e, ao hospedeiro, tais como: imunossupressão, tabagismo, infecção com outras doenças sexualmente transmissíveis, deficiências nutricionais e uso de anticoncepcional oral, tem sido relacionadas com a persistência da infecção, o que representa o fator central de progressões.⁶ É necessária atenção aos fatos que permeiam a influência na aquisição desta doença, pois estudos apontam que fatores como baixa escolaridade e baixa condição socioeconômica contribuem para a não adesão ao tratamento das lesões precursoras e, conseqüentemente, para o aumento da incidência da doença.⁷ As atividades das MMPs são especificamente inibidas pelos TIMPs (Inibidores de tissulares de metaloproteinasas), constituído por um grupo de quatro tipos: TIMP-1, -2, -3 e -4. Baseado em seus substratos, as MMPs tem sido divididas em subclasses distintas: colagenases (MMP-1, -8 e -13), gelatinases (MMP-2 e -9), estromelisinases (MMP-3, -7 e -10), matrilisinas (MMP-7 e -26) e tipo membrana (MMP-14, -15, -16, -17 e -24).⁸ As TIMPs são responsáveis por efeitos contrários à progressão neoplásica, ou seja, seu aumento está relacionado ao comprometimento da ação das MMPs, assim como o RECK (*Reversion-inducing Cysteine-Rich Protein*), que pode

regular MMP-2, -9 e MT1-MMP, por exemplo. Estudos têm constatado diminuição do RECK em cânceres pancreático, mamário, de pulmão, próstata, colorretal, hepatocarcinoma e neuroblastoma.^{9,10}

A infecção por HPV é considerada a doença sexualmente transmissível mais frequente na população mundial e também um problema de saúde pública. Acredita-se que sete em cada dez mulheres sexualmente ativas foram expostas ao vírus, no mínimo uma vez em suas vidas. A maioria das infecções regride em um período de dois anos, outras permanecem em estado de latência ou se mantêm como lesões precursoras do câncer sem evoluir para estágios mais graves. Outro grupo menor de infecções por HPV de alto risco persistentes resulta em progressão para câncer após um longo período de latência e os programas de rastreamento em vários países do mundo vêm utilizando as técnicas de citologia oncótica, biologia molecular e, recentemente, campanhas vacinais visando redução de suas taxas.

A persistência da infecção pelo Papillomavirus humano é a condição necessária para o desenvolvimento câncer de colo uterino, mas não única. Os cofatores e a disponibilidade de diversas vias no hospedeiro podem ser utilizadas pelo vírus para se estabelecer; entre elas, pode-se destacar o papel das metaloproteinases de matriz e seus inibidores. O estudo dessas proteínas pode representar um potencial diagnóstico e terapêutica já que estão presentes em todo o processo carcinogênico, do início das lesões até a invasão neoplásica.

Estudar as metaloproteinases e seus inibidores poderá resultar em novas abordagens diagnósticas e terapêuticas, além de contribuir na elucidação da carcinogênese cervical. Com isso, esse trabalho teve como principal objetivo correlacionar a expressão de inibidores de metaloproteinases de matriz (TIMP-2 e RECK) com lesões cervicais intraepiteliais e invasivas. Para tanto, buscou-se avaliar individualmente a expressão de TIMP-2 e RECK em lesões cervicais, no citoplasma e núcleo de células epiteliais, comparando os grupos de células epiteliais no tecido glandular e escamoso.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, seguindo todos os critérios estabelecidos para sua aceitação. O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), através do CAAE nº 17068913.6.0000.5208 (Anexo A), obedecendo

integralmente aos princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). As amostras foram obtidas de forma anônima e identificadas por numeração.

Foram utilizadas 115 amostras de biópsias de lesões cervicais uterinas, arquivadas entre 2011 e 2015 no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas de Recife, Pernambuco, Brasil. Foram avaliadas as fichas de diagnósticos histopatológicos dos casos obtidos através de cirurgia por conização, arquivados no Laboratório de Anatomia Patológica. Foram incluídos os casos positivos para NIC e Câncer Cervical. Foram excluídos os casos para os quais não foi possível localizar o bloco ou lâmina referente para confirmação do diagnóstico. Os casos foram divididos de acordo com o diagnóstico histopatológico, nos seguintes grupos: NIC I (5), NIC II (21), NIC III (57) e CC (10). Os casos para controle (9) foram originados de miomas uterinos. As amostras foram oriundas de tratamento por conização.

Imunohistoquímica

A imunohistoquímica para os inibidores foi realizada utilizando lâminas silanizadas contendo cortes de 4µm de espessura de porções representativas do tumor parafinado. Inicialmente, as amostras foram desparafinadas em xilol e incubadas por 60' em estufa a 60° C. Posteriormente, foram incubadas em xilol II por 30' à temperatura ambiente, seguido de imersão na sequência de álcool etílico 100%, 100%, 100% e 70%, por 5' cada, H₂O corrente por 5' e PBS por 5'. Depois, foi realizada a recuperação antigênica na panela de pressão elétrica contendo tampão citrato pH 6,0. As lâminas sofreram resfriamento a temperatura ambiente e foram, então, imersas em H₂O₂ + metanol (1:1) por 30', H₂O corrente por 5' e PBS 2x5'. Foi realizado bloqueio com PBS-BSA 1% por 1 hora à temperatura ambiente, imersão em PBS 2x5', incubação com anticorpo primário anti-TIMP 2 (SC-21735; 1:300) e anti-RECK (Policlonal Biorbyt 095980; 1:200) por 2 horas em câmara úmida a 37°C, imersão em PBS 2x5', incubação com anticorpo secundário (ADVANCETM HRP Link; Dako, Glostrup, Denmark) por 20' à temperatura ambiente e imersão em PBS 2x5'. As lâminas foram incubadas com o anticorpo terciário (ADVANCETM HRP Enzyme; Dako, Glostrup, Denmark) por 20' e, depois, com solução cromógena de diaminobenzidina (20 µL Liquid DAB+Chromagen + 1 mL Buffer Substrate; Dako, Glostrup, Denmark) em média por 3'. Em seguida, foram imersas em H₂O destilada por 1', H₂O corrente por 5', contra coradas em

hematoxilina de Mayer 5", imersas em H₂O corrente 5', álcool etílico 70%, 100%, 100% e 100% por 3' cada, xilol I e II por 5' cada, seguido da montagem das lâminas com Entelan.

Baseado no artigo de Brummer et al. (2002), os casos foram analisados semiquantitativamente através da intensidade de reação em mais de 100 células epiteliais e mesenquimais no grupo controle e das lesões cervicais.

Foi considerado o tipo celular (epitelial escamoso e glandular), bem como a posição das reações (núcleo ou citoplasma). Sendo classificados como positivos: fraco (+), moderado (++) e forte (+++) através da intensidade da marcação. Foi usado o seguinte parâmetro de eliminação: marcação pontual (apenas em um espaço pequeno e limitado) não foi considerado, quando a marcação era difusa foi analisada a intensidade da marcação.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software SPSS for Windows v13.0. Foi aplicado o teste Qui-quadrado (χ^2) para associação entre os grupos de variáveis qualitativas ordinais: intensidades da expressão IHQ e graus histopatológicos de lesões cervicais. A significância estatística foi definida em $p < 0,05$.

RESULTADOS

Foram utilizadas 115 amostras de tecidos de lesões cervicais emblocadas em parafina, das quais 9 pertenciam ao Grupo Controle, 5 ao Grupo NIC I, 21 ao Grupo NIC II, 57 ao Grupo NIC III e 10 ao Grupo CC. Foram utilizadas 98 amostras que continham representação de epitélio escamoso e 97 amostras que apresentavam epitélio glandular para a análise imunohistoquímica de TIMP-2, porém 102 amostras apresentavam epitélio escamoso e 100 continham epitélio glandular para a análise de imunohistoquímica de RECK, observando a positividade em citoplasma e núcleo.

TIMP-2

A análise imunohistoquímica para TIMP-2 em epitélio escamoso foi realizada com 98 amostras de tecido, sendo 8 de carcinoma cervical (CC), 57 de lesões NIC III, 21 de lesões NIC II, 5 de lesões NIC I e 7 do Grupo Controle. Foi observada reatividade fraca no

citoplasma de 28,5% dos controles, sem nenhuma lâmina demonstrar reatividade moderada ou forte. Nos demais grupos, cerca de 38% das lâminas apresentou reatividade fraca, além de algumas mostrarem reatividade moderada ou forte. A porcentagem das amostras com reatividade moderada e forte aumentou de acordo com a severidade da lesão.

Quanto ao núcleo no epitélio escamoso, a quase totalidade das amostras não apresentou TIMP-2, enquanto 28,5% dos controles o fez. Este resultado foi estatisticamente significativo ($p = 0,001$). Resultados na Tabela 1.

A análise imuno-histoquímica para TIMP-2 em epitélio glandular de amostras com células escamosas displásicas foi realizada com 97 amostras de tecido, das quais 8 eram de CC, 56 de NIC III, 21 de NIC II, 5 de NIC I e 7 do Grupo Controle. Nenhuma amostra do Grupo Controle, NIC I ou NIC II foi positiva para TIMP2 no citoplasma e núcleo. Das amostras de NIC III, 6% demonstraram positividade no citoplasma. Das amostras de CC, uma (12,5%) demonstrou positividade fraca. Resultados na Tabela 2.

RECK

Quanto ao RECK, foram realizados procedimentos similares, com 102 amostras com tecido epitelial escamoso, sendo 10 de CC, 57 de NIC III, 21 de NIC II, 5 de NIC I e 9 do Grupo Controle. Enquanto 67% das amostras do Grupo Controle apresentaram fraca positividade, 60% das amostras de NIC I apresentaram positividade moderada, 76% das amostras de NIC II apresentaram positividade fraca ou moderada e 93% das amostras de NIC III foram reativas, das quais 65% apresentou reatividade moderada ou forte. Das amostras de CC, 20% foram fracamente positivas, e 60% moderadamente positivas, mas nenhuma apresentou reatividade intensa. Logo, estes resultados mostram que a expressão de RECK no citoplasma de células epiteliais escamosas é significativamente maior quanto maior o grau de lesão do tecido, exceto no CC, onde a expressão é menor que a das lesões NIC III ($p = 0,019$).

No núcleo 66,6% das amostras do Grupo Controle demonstrou positividade, metade destas sendo fraca, e a outra metade moderada. As amostras de NIC I não foram positivas, e apenas 4,7, 1,7 e 10% das amostras de NIC II, NIC III e CC foram moderadamente positivas, respectivamente. Estes resultados demonstram que a expressão nuclear de RECK em células epiteliais escamosas é significativamente menor nos tecidos displásicos ($p < 0,001$). Os dados detalhados destas análises estão disponíveis na Tabela 3.

Das 100 amostras que continham células epiteliais glandulares , 10 foram de CC, 55 de NIC III, 21 de NIC II, 5 de NIC I e 9 do Grupo Controle. Nas análises de citoplasma, nenhuma amostra do Grupo Controle, NIC I e NIC II foi positiva, havendo 3,6% de positividade nas lesões de NIC III, todas com reatividade fraca ou moderada, e 10% de positividade moderada nas amostras de CC. Nenhuma das amostras apresentou positividade nuclear. Os dados detalhados destas análises estão disponíveis na Tabela 4.

DISCUSSÃO

Estudos têm demonstrado a importante relação entre as MMPs e diversos tipos de câncer que se dá principalmente através da degradação da MEC, permitindo a angiogênese, migração e reprodução celular.⁹ A progressão tumoral está diretamente ligada ao aumento da produção e secreção de MMPs.¹¹ Estas interações são muito complexas, devido expressão e às funções variadas das MMPs e inibidores em diferentes células e fases do tumor.^{12,13} Entre as as MMPs e a progressão das lesões cervicais é possível destacar as MMP2, MMP9 e MT1-MMP, todas supostamente inibidas por RECK e TIMP2.^{14,15,16}

Os inibidores de MMPs, por sua vez, são associados a efeitos contrários à progressão, já que inibem a ação das MMPs, dificultando os processos de proliferação, angiogênese e migração.⁹ Desta forma, diminuem o poder de invasividade e potencial metastático, resultando em melhor prognóstico.¹⁷

No presente estudo, foi possível constatar aumento da expressão citoplasmática de RECK em células escamosas proporcional à severidade da lesão, até chegar ao nível de CC, onde esta diminui. Este aumento pode refletir uma compensação pelo aumento da expressão de MMPs durante a progressão das lesões, havendo em certo ponto a sub regulação da expressão de RECK, o que tornaria a lesão invasiva, essa análise mostra que RECK isoladamente é ineficiente podendo não ser um bom marcador. RECK mostrou que nas lesões há uma tentativa de diminuir a atividade das MMPs, mas como os mecanismos não são suficientes para bloquear a progressão, a expressão de RECK cai facilitando o estabelecimento da invasão e metástase. Essa diminuição da atividade de RECK pode está associada a superexpressão de E6 e E7 do HPV de alto risco. Não foram encontrados estudos com resultados similares na literatura. Sabe-se que a baixa expressão de RECK está associada a metástases,¹⁸ e que quando superexpresso diminui a invasividade de diversas neoplasias.^{19,20}

A expressão de TIMP2 e RECK é fraca nos núcleos de células escamosas, tornando-se praticamente ausente à medida que o NIC avança. Este achado é condizente com a literatura, que demonstra diminuição dos níveis de inibidores de MMPs de acordo com a progressão das lesões cervicais.¹⁵

Segundo Branca e colaboradores,²¹ a expressão de TIMP2 pode ser utilizada como marcador prognóstico para o risco de invasão tecidual das lesões cervicais uterinas. Entretanto, é errado considerar os TIMPs como meros inibidores das MMPs.²² Sua vasta gama de funções torna difícil o esclarecimento de seu papel na displasia cervical uterina. De fato, os TIMPs podem agir como moduladores fenotípicos de fibroblastos e inibidores da angiogênese e migração endotelial no miocárdio. Também são inibidores da proliferação de cardiomiócitos fetais e ainda estão envolvidos no remodelamento miocárdico através de processos inflamatórios.²³ Além de suas funções independentes de MMPs, TIMP2 ainda pode agir de forma contrária à esperada, aumentando a atividade da MMP2, através de sua interação com MT1-MMP.²⁴

A RECK, além de encontrar sua expressão fortemente alterada nas lesões displásicas da cérvix uterina, apresentou importante papel na fisiopatologia de outros tipos de tumor. Sua importância é tanta que ele pode ser usado como marcador prognóstico relativo à sobrevivência em tumores colorretais e outras doenças neoplásicas.^{25,26} Isto chama a atenção para uma possível utilização futura do RECK como marcador prognóstico em lesões do colo do útero.

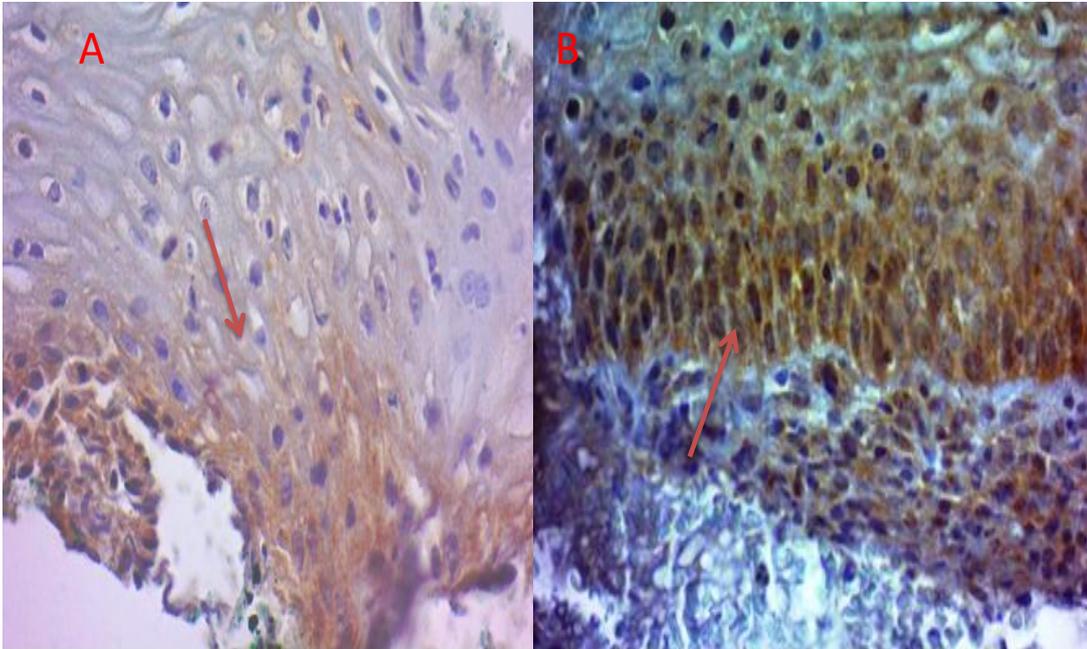


Figura 1 – Expressão da IHQ TIMP-2 e RECK. **A** Amostra sem reatividade para TIMP2 no núcleo e reatividade fraca (+) no citoplasma de células escamosas do Grupo NIC I (400x). **B** - Amostra com reatividade moderada (++) a TIMP2 no citoplasma de células escamosas e fraca (+) no citoplasma de células glandulares do Grupo CC (400x).

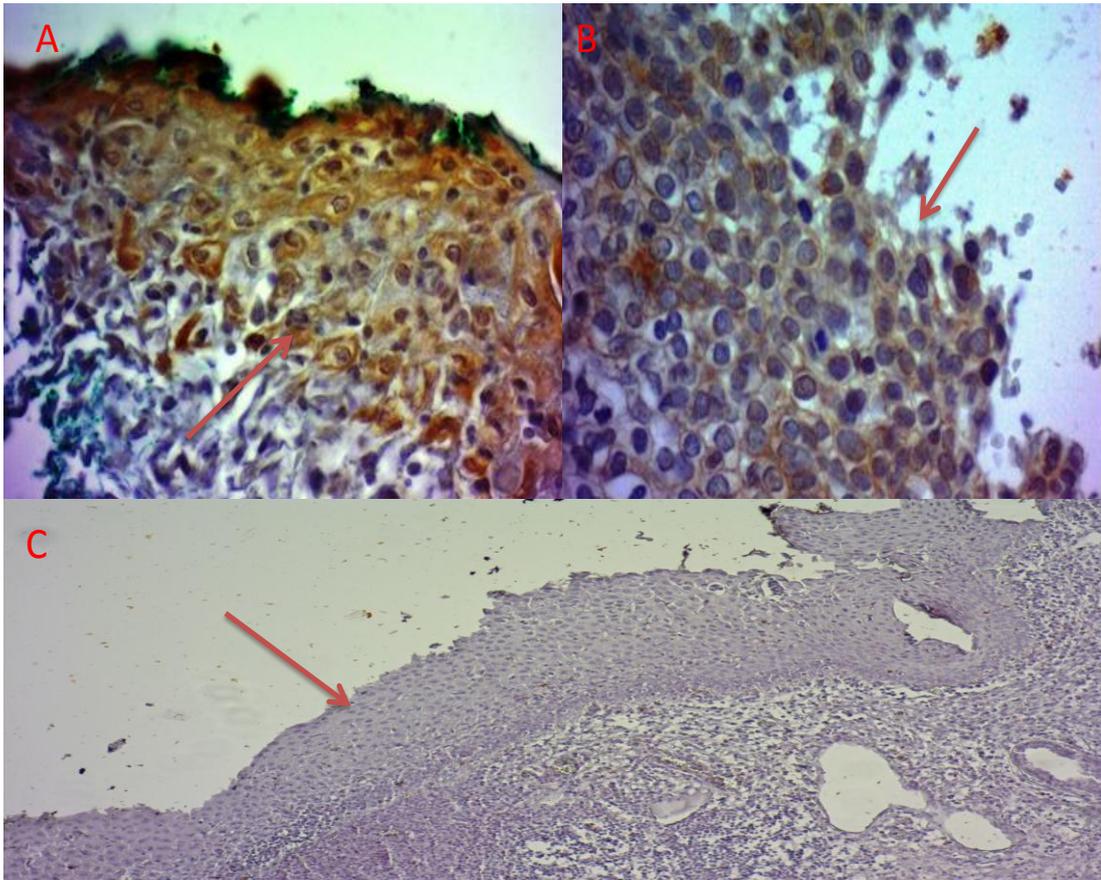


Figura 2 – Expressão da IHQ TIMP-2 e RECK. **A** - Amostra com reatividade forte (+++) ao RECK em citoplasma de células escamosas do Grupo NIC III (400x). **B** - Amostra com reatividade moderada (++) ao RECK no citoplasma de células escamosas do Grupo CC (400x). **C** - Ausência de expressão nas células escamosas de NIC I (200X).

Tabela 1 - Expressão imunohistoquímica de TIMP2 no citoplasma e núcleo das células epiteliais escamosas da cérvix uterina

<i>Células epiteliais escamosas</i>	<i>Citoplasma</i>					<i>Núcleo</i>				
	-	+	++	+++	<i>N</i>	-	+	++	+++	<i>N</i>
<i>CC</i>	1	3	3	1	8	8	0	0	0	8
	12,5%	37,5%	37,5%	12,5		100,0%				
<i>NIC III</i>	16	22	17	2	57	56	0	0	1	57
	28,1%	38,6%	29,8%	3,5%		98,2%			1,8%	
<i>NIC II</i>	7	8	6	0	21	21	0	0	0	21
	33,5,%	38,0%	28,5%			100,0%				
<i>NIC I</i>	2	2	1	0	5	5	0	0	0	5
	40,0%	40,0%	20,0%			100,0%				
<i>Controle</i>	5	2	0	0	7	5	2	0	0	7
	71,5%	28,5%				71,5%	28,5%			
	<i>Total</i> 98					<i>Total</i> 98				
	<i>p</i> = 0,548					<i>p</i> = 0,001*				

Foi encontrada uma tendência à maior reatividade citoplasmática para TIMP2 de acordo com a progressão das lesões. A expressão nuclear de TIMP2, no entanto, foi significativamente menor em relação ao controle. CC = Carcinoma cervical, NIC = Neoplasia Intraepitelial Cervical.

*Associação estatística significativa

Fonte: Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas de Recife.

Tabela 2 - Expressão imunohistoquímica de TIMP2 no citoplasma e núcleo das células epiteliais glandulares da cérvix uterina na presença de células escamosas displásicas.

<i>Células epiteliais glandulares</i>	<i>Citoplasma</i>					<i>Núcleo</i>				
	-	+	++	+++	<i>N</i>	-	+	++	+++	<i>N</i>
<i>CC</i>	7 87,5%	1 12,5%	0	0	8	8 100,0%	0	0	0	8
<i>NIC III</i>	53 94,0%	1 2,0%	1 2,0%	1 2,0%	56	56 100,0%	0	0	0	56
<i>NIC II</i>	21 100,0%	0	0	0	21	21 100,0%	0	0	0	21
<i>NIC I</i>	5 100,0%	0	0	0	5	5 100,0%	0	0	0	5
<i>Controle</i>	7 100,0%	0	0	0	7	7 100,0%	0	0	0	7
<i>Total</i> 97					<i>Total</i> 97					
<i>p</i> = 0,888					<i>p</i> = *					

Não foi encontrado aumento significativo na expressão de TIMP2 no citoplasma ou núcleo de células epiteliais glandulares em relação aos controles. CC = Carcinoma cervical, NIC = Neoplasia Intraepitelial Cervical.

*Estatística não computada

Fonte: Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas de Recife.

Tabela 3 - Expressão imunohistoquímica de RECK no citoplasma e núcleo das células epiteliais escamosas da cérvix uterina.

<i>Células epiteliais escamosas</i>	<i>Citoplasma</i>				<i>N</i>	<i>Núcleo</i>				<i>N</i>	
	-	+	++	+++		-	+	++	+++		
<i>CC</i>	2 20,0%	2 20,0%	6 60,0%	0	10	9 90,0%	0	1 10,0%	0	10	
<i>NIC III</i>	4 7,0%	16 28,0%	35 61,5%	2 3,5%	57	56 98,3%	0	1 1,7%	0	57	
<i>NIC II</i>	5 24,0%	10 47,5%	6 28,5%	0	21	20 95,3%	0	1 4,7%	0	21	
<i>NIC I</i>	2 40,0%	0	3 60,0%	0	5	5 100,0%	0	0	0	5	
<i>Controle</i>	3 33,0%	6 67,0%	0	0	9	3 33,3%	3 33,3%	3 33,3%	0	9	
<i>Total</i>					102	<i>Total</i>					102
<i>p =</i>					0,019*	<i>p <</i>					0,001*

Há aumento da expressão de RECK no citoplasma de células epiteliais escamosas quanto maior o NIC, sendo um pouco menor no CC. A presença de RECK no núcleo das células infectadas, por outro lado, torna-se muito menor que a das células do grupo controle. CC = Carcinoma cervical, NIC = Neoplasia Intraepitelial Cervical.

*Associação estatística significativa

Fonte: Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas de Recife.

Tabela 4 - Expressão imunohistoquímica de RECK no citoplasma e núcleo das células epiteliais glandulares da cérvix uterina na presença de células escamosas displásicas.

<i>Células epiteliais glandulares</i>	<i>Citoplasma</i>					<i>Núcleo</i>					
	-	+	++	+++	<i>N</i>	-	+	++	+++	<i>N</i>	
<i>CC</i>	9 90,0%	0	1 10,0%	0	10	10 100,0%	0	0	0	10	
<i>NIC III</i>	53 96,4%	1 1,8%	1 1,8%	0	55	55 100,0%	0	0	0	55	
<i>NIC II</i>	21 100,0%	0	0	0	21	21 100,0%	0	0	0	21	
<i>NIC I</i>	5 100,0%	0	0	0	5	5 100,0%	0	0	0	5	
<i>Controle</i>	9 100,0%	0	0	0	9	9 100%		0	0	9	
<i>Total</i>					100	<i>Total</i>					100
<i>p =</i>					0,777	<i>p =</i>					*

É possível notar um pequeno crescimento na expressão de RECK no citoplasma de células epiteliais glandulares NIC III e de CC. Nenhuma amostra teve reatividade em núcleos. CC = Carcinoma cervical, NIC = Neoplasia Intraepitelial Cervical.

*Estatística não computada

Fonte: Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas de Recife.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que o balanço entre as MMPs e seus inibidores pode ser importante para a determinação do potencial invasivo e prognóstico, tanto em relação à disseminação quanto à sobrevida. Muitos trabalhos têm demonstrado uma correlação positiva entre a manutenção de RECK em tumores e um melhor prognóstico em relação à diminuição de invasão e metástase. O presente estudo apresentou limitações quanto a padronização da quantidade de casos em cada grupo, porém encontrou níveis aumentados de RECK no citoplasma de células epiteliais escamosas da cérvix uterina, sendo estes mais altos nas lesões intraepiteliais mais severas, mas nem tanto nas lesões invasivas, e diminuição dos níveis deste e de TIMP2 no núcleo destas células.

REFERÊNCIAS

1. zur Hausen H. Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996;1288(2):F55-78.
2. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55(4):244-65.
3. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, et al. Human Papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer* 2011;128(4):927-35.
4. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348(6):518-27.
5. Rivoire WA, Cortela HVE, Brum IS, et al. Biologia molecular do câncer cervical. *Rev. Bras. Saude Matern. Infant.* 2006;6(4):447-51.
6. Freitas AC, Gurgel AP, Chagas BS, et al. Susceptibility to cervical cancer: An overview. *Gynecol Oncol* 2012;126(2):304-11.
7. Carvalho MCMP, Queiroz ABA. Mulheres Portadoras de Lesões Precursoras do Câncer do colo do útero e HPV: Descrição do perfil socioeconômico e demográfico. *DST - J bras Doenças Sex Transm* 2011;23(1):28-33.
8. Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol* 2009;29(31):5287-97.
9. Dong, Q. *et al.* 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.
10. Furumoto K, Arii S, Mori A, et al. RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. Reverse-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs. *Hepatology* 2001;33(1):189-95.

11. Stetler-Stevenson WG. The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Cancer Metastasis Rev* 2008;27(1):57-66
12. Valdivia A, Peralta R, Matute-González M, et al. 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.
13. Yadav L, Puri N, Rastogi V, et al. Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(3):1085-91.
14. Sheu BC, Lien HC, Ho HN, et al. Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer. *Cancer Res* 2003;63(19):6537-42.
15. Cardeal LB, Boccardo E, Termini L, et al. HPV16 oncoproteins induce MMPs/RECK-TIMP-2 imbalance in primary keratinocytes: possible implications in cervical carcinogenesis. *PLoS One* 2012;7(3):e33585.
16. Dingjun Z, Mei Y, Wei Z. 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):4981-9.
17. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(12):786-801.
18. Chung TT, Yeh CB, Li YC, et al. Effect of RECK Gene Polymorphisms on Hepatocellular Carcinoma Susceptibility and Clinicopathologic Features (RECK Gene Polymorphisms on HCC). *PLoS ONE* 2012;7(3):e33517.
19. Liang QX, Liang YC, Xu ZY, et al. RECK overexpression reduces invasive ability in ameloblastoma cells. *J Oral Pathol Med* 2014;43(8):613-8.
20. Rabien A, Ergün B, Erbersdobler A, et al. RECK overexpression decreases invasive potential in prostate cancer cells. *Prostate* 2012;72(9):948-54.

21. Branca M, Ciotti M, Giorgi C, 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.
22. Vandembroucke RE, Libert C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nat Rev Drug Disc* 2014;13:904-27.
23. Vanhoutte D, Heymans S. TIMPs and cardiac remodeling: 'Embracing the MMP-independent-side of the family'. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48:445-53.
24. Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, et al. The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem* 1998;273(2):871-80.
25. Stenzinger A, von Winterfeld M, Rabien A, et al. Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motif (RECK) expression: an independent prognostic marker of survival in colorectal cancer. *Hum Pathol* 2012;43(8):1314-21.
26. Takeuchi T, Hisanaga M, Nagao M, et al. The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(16):5572-9.

REFERÊNCIAS

AKGÜL, B. et al. The E2 protein of human papillomavirus type 8 increases the expression of matrix metalloproteinase-9 in human keratinocytes and organotypic skin cultures. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 200, n. 2, p. 127-35, mai. 2011.

AYRES, A.R.G.; SILVA, G.A. . Prevalência de infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil: revisão sistemática. **Ver. Saúde Pública**, v. 44, n.5, p. 963-74, 2010.

BALDEZ DA SILVA, M. F. et al. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. **Genet. Mol. Res.**, v. 8, n.4, p. 1437-43, 2009.

BERGERON, C. et al. Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 133, n. 3, p. 395-406, 2010

BEZERRA, S.J.S., GONÇALVES, P.C., FRANCO, E.S., PINHEIRO, A.K.B. Perfil de mulheres portadoras de lesões cervicais por hpv quanto aos fatores de risco para câncer de colo uterino. **DST – J. bras. Doenças Sex. Transm.**, v.17, n.2 p.143-8, 2005.

BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 15, p. 786-801, dez. 2014.

BOSCH, F.X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J. Clin. Pathol.**, v. 55, n. 4, p. 244-65, abr. 2002.

BRANCA, M. et al. HPV-PathogenISS Study Group. 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.**, v. 26, n. 2B, p. 1543-56, mar./abr. 2006.

BUTLER, G.S. et al. The TIMP2 Membrane Type 1 Metalloproteinase “Receptor” Regulates the Concentration and Efficient Activation of Progelatinase A. **J Biol Chem**, v. 273, n. 2, p. 871-80, jan. 1998.

BRUCE, A. et al. In: *Molecular Biology of Cell*. 4ª edição. New York and London: **Garland Science**; 2002

BRUMMER, O. et al. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation--an immunohistochemical study. *Gynecologic Oncology*, v. 84, n. 2, p. 222–7, 2002

CARDEAL, L. B. da S. et al. HPV16 oncoproteins induce MMPs/RECK-TIMP-2 imbalance in primary keratinocytes: possible implications in cervical carcinogenesis. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33585, mar. 2012.

CARVALHO, M.C.M.P.; QUEIROZ, A.B.A. Mulheres Portadoras de Lesões Precursoras do Câncer do colo do útero e HPV: Descrição do perfil socioeconômico e demográfico. **DST - J. bras. Doenças Sex. Transm.**, n. 23, v. 1, p. 28-33, 2011.

CATTANI, P. et al. Clinical performance of human papillomavirus E6 and E7 mRNA testing for high-grade lesions of the cervix. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 12, p. 3895-901, 2009.

CHUNG, T.T. et al. Effect of RECK Gene Polymorphisms on Hepatocellular Carcinoma Susceptibility and Clinicopathologic Features (RECK Gene Polymorphisms on HCC). **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33517, 2012.

DELABIO-FERRAZ E; AGUIAR NETO JP; TAKIYA CM; LACOMBE DP. Rana Catesbeiana, Pólvora e Modulação Supramolecular Cicatrização Intestinal e Prognóstico no Câncer de Cólon: Uma Mesma Origem Biológica para o Insucesso? **Rev bras Coloproct**, 2010, v.30, n. 2 p.141-151.

DE RODA HUSMAN, A. M. et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **J. Gen. Virol.**, London, v. 76, n. 4, p. 1057-62, abr. 1995.

DINGJUN, Z.; MEI, Y.; WEI, Z. 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.**, v. 8, n. 8, p. 4981-9, 2015.

DONG, Q. *et al.* 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.** v. 91, n. 4, p. 368-373, 2010.

DOORBAR, J. The Papillomavirus life cycle. **J. Clin. Virol.**, v. 32, p. S7-S15, 2005. Suplemento 1.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New Functions for the Matrix Metalloproteínases in Cancer Progression. **Nat. Rev. Cancer**, v.2, p.161-74, 2002.

FRAZER, I. Correlating immunity with protection for HPV infection. **Int. J. Infect. Dis.**, v.11, p. 10-6, 2007.

FEDRIZZI, E.N. *et al.* Infecção pelo papilomavírus humano (hpv) em mulheres de Florianópolis, Santa Catarina. **DST - J. bras. Doenças Sex. Transm.**, v. 20, n.2, p. 73-9, 2008.

FERLAY, J. *et al.* Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer. **Globocan.**, v. 1, n. 11, 2013.

FERRAZ, L.C; SANTOS, A.B.R; DISCACCIATI, M.G. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. **J. Health Sci. Inst.**, v. 30, n.2, p. 107-11, 2012.

FREITAS, A.C. *et al.* Susceptibility to cervical cancer: An overview. **Gynecol. Oncol.**, v. 126, n. 2, p. 304-11, ago. 2012.

FURUMOTO, K. *et al.* RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. Reverse-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs. **Hepatology**, v. 33, n. 1, p. 189-95, 2001.

HO, G.Y. et al. Natural history of cervicovaginal Papillomavirus infection in young women. **N. Engl. J. Med.**, v. 338, n. 7, p. 423–8, 1998.

INCA - Instituto Nacional de Câncer (Brasil). **Estimativa 2012**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

INCA – Instituto Nacional de Câncer (Brasil). **Estimativa 2014**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

ITO, M.M. et al. Dimensão da participação do Papilomavírus humano (HPV) na evolução do câncer cérvico-vaginal. **RBAC.**, v. 42, n.2, p. 127-9, 2010.

KARLSEN, F. et al. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 34, n. 9, p. 2095-100, set. 1996.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell.**, v.141, n.1, p. 52-67, 2010.

LECO, K.J. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. **J Biol Chem**, v. 269, n. 12, p. 9352-60, mar. 1994.

LI, N. et al. Human Papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. **Int. J. Cancer**, v. 128, n. 4, p. 927-35, 2011.

LIANG, Q.X. et al. RECK overexpression reduces invasive ability in ameloblastoma cells. **J Oral Pathol Med**, v. 43, n. 8, p. 613-8, set. 2014.

MANOS, M. M. et al. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. **Cancer Cells**, v. 7, p. 209-14, 1989.

MISSAOUI, N. et al. p16^{INK4A} overexpression in precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix in Tunisian women. **Pathol. Res. Pract.**, Stuttgart, v. 206, n. 8, p. 550-5, ago. 2010.

MOODY, C.A.; LAIMINS, L.A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nat. Rev.**, v. 10, 2010.

MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 348, n. 6, p. 518-27, fev. 2003.

MÜNGER, K.; HOWLEY, P. M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. **Virus Res.**, Amsterdam, v. 89, n. 2, p. 213-28, nov. 2002.

MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, n. 5, p. 290–308, 2008.

OH, J. et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. **Cell.**, v. 107, n. 6, p. 789-800, 2001.

PAGE-McCAW, A.; EWALD, A.J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 8, p. 221-33, mar. 2007.

PITTAYAKHAJONWUT, D.; ANGELETTI, P. C. Viral trans-factor independent replication of human papillomavirus genomes. **Virol. J.**, London, v. 7, p. 123, jun. 2010.

QUEIROZ, D.T.; PESSOA, S.M.F.; SOUSA, R.A. Infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV): incertezas e desafios. **Acta Paul. Enferm.**, v.18, n. 2, p.190-6, 2005.

RABIEN, A. et al. RECK overexpression decreases invasive potential in prostate cancer cells. **Prostate**, v. 72, n. 9, p. 948-954, 2012.

RAJCÁNI, J. et al. Detection of regulatory protein p16/INK4A in the dysplastic cervical squamous cell epithelium is a diagnostic tool for carcinoma prevention. **Cesk. Patol.**, Praha, v. 45, n. 4, p. 101-7, out. 2009.

RAMA, C.H. et al. Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. **Rev. Saúde Pública**, v. 42, n. 1, p. 123-30, 2008.

RAMIREZ, F.; RIFKIN, D.B. Cell signaling events: a view from the matrix. **Review Matrix Biol.**, v.22, n.2, p. 101-7, abr. 2003.

RIVOIRE, W.A. et al. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. **Rev. bras. Cancerologia**, v. 47, n. 2, p. 179-84, 2001.

RIVOIRE, W.A. et al. Biologia molecular do câncer cervical. **Rev. bras. Saúde Matern. Infant.**, v.6, n.4, p. 447-51, out./dez. 2006.

ROY, R.; YANG, J.; MOSES, M. A. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. **J. Clin. Oncol.**, Alexandria, v. 27, n. 31, p. 5287-97, nov. 2009.

RUDEK MA, VENITZ J, FIGG WD. Matrix metalloproteinase inhibitors: do they have a place in anticancer therapy? **Pharmacotherapy** v. 22, p. 705-720, 2002.

SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v. 239, n. 4839, p. 487-91, jan. 1988.

SCHRÖPFER, A. et al. Expression pattern of matrix metalloproteinases in human gynecological cancer cell lines. **BMC Cancer**, v. 10, p. 553, out. 2010.

SHEU, B. C. et al. Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer. **Cancer Res.**, v. 63, n. 19, p. 6537-42, out. 2003.

SCHULZ, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, p. 211–242, 2007.

SILVA NETO, J.C. **Citologia do trato genital feminino**. Rio de Janeiro. Revinter, 2012.

SOLOMON, D. et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA**, Chicago, v. 287, n. 16, p. 2114-9, abr. 2002.

STEBEN, M.; DUARTE-FRANCO, E. Human Papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 107, n. 2, p. S2-S5, nov. 2007. Suplemento 1.

STENZINGER, A. et al. Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motif (RECK) expression: an independent prognostic marker of survival in colorectal cancer. **Hum Pathol**, v. 43, n. 8, p. 1314-21, 2012.

STETLER-STEVENSON, W. G. The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. **Cancer Metastasis Rev**, Boston, v. 27, n. 1, p. 57–66, mar. 2008.

TAKEUCHI, T. et al. The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 16, p. 5572-9, ago. 2004.

VALDIVIA, A. et al. Co-expression of metalloproteinases 11 and 12 in cervical scrapes cells from cervical precursor lesions. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, Madison, v. 4, n. 7, p. 674-82, out. 2011.

VANDENBROUCKE, R.E.; LIBERT, C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? **Nat. Rev. Drug Disc.**, v. 13, p. 904-27, dez. 2014.

VANHOUTTE, D.; HEYMANS, S. TIMPs and cardiac remodeling: ‘Embracing the MMP-independent-side of the family’. **J Mol Cell Cardiol**, v. 48, p. 445-53, mar. 2010.

YADAV, L. et al. Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy. **Asian Pac. J. Cancer. Prev.**, v.15, n. 3, p. 1085-91, 2014.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1288, n. 2, p. F55-F78, out. 1996.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in human cancers. **Proc. Assoc. Am. Physicians**, Cambridge (USA), v. 111, n. 6, p. 581-7, nov./dez. 1999.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat. Rev. Cancer**, London, v. 2, n. 5, p. 342-50, mai. 2002.

ANEXO A – PARECER DO CEP/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: 17088913.8.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIENCIA 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 dos 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

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 multinfecções, 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 invasora do colo do útero”, coordenado pela pesquisadora Marilea de Lima Guimarães e aprovado pelo CEP/CCS/UFPE sob o CAAE: 09307612.8.0000.5208 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 CCB
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br