

Lianne D'Oleron Lima Vasconcelos

Análise imuno-histoquímica das metaloproteinases da matriz 2 e 9 nas
lesões intraepiteliais e invasivas da cérvix uterina

Recife

2015

Lianne D'Oleron Lima Vasconcelos

Análise imuno-histoquímica das metaloproteinases da matriz 2 e 9 nas
lesões intraepiteliais e invasivas da cérvix uterina

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

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas

Recife

2015

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

V331a Vasconcelos, Lianne D'Oleron Lima.
 Análise imuno-histoquímica das metaloproteinases da matriz 2 e 9
 nas lesões intraepiteliais e invasivas da cérvix uterina / Lianne D'Oleron
 Lima Vasconcelos. – Recife: O autor, 2015.
 56 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. Metaloproteinases da matriz. 2. Papilomavírus humano. 3.
 Neoplasias do colo uterino. I. Silva Neto, Jacinto da Costa (Orientador).
 II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2015-206)



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Centro de Ciências da Saúde - UFPE

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

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

Fone/Fax: (81) 2126.8529

<http://www.ppgpatologiaufpe.com>

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.

AUTORA: LIANNE D'OLERON LIMA VASCONCELOS

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA

**NOME DA DISSERTAÇÃO: “ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS
METALOPROTEINASES DA MATRIZ 2 E 9 NAS LESÕES INTRAEPITELIAIS E
INVASIVAS DA CÉRVIX UTERINA”.**

ORIENTADOR: PROF. DR. JACINTO DA COSTA SILVA NETO

DATA DA DEFESA: 11 DE SETEMBRO DE 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Prof^a. Dr^a. Adrya Lúcia Peres Bezerra de Medeiros

Prof. Dr. Luiz Lucio Soares da Silva

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, Criador da vida, por tudo que É e tem feito para o meu bem, por ser meu Consolo e Refúgio nos momentos difíceis.

À minha família, meus pais sempre dedicados Amauri e Lúcia e minha irmã Aline, pelo seu apoio incondicional.

À Fellipe, meu amor, pelo seu companheirismo, compreensão, paciência e apoio.

Aos colegas do Mestrado em Patologia, pela motivação nessa trajetória, sempre muito companheiros e ajudadores.

À Mirella Lima, em especial, com quem compartilhei todos os momentos de dúvida, entusiasmo, decepção, cansaço, desespero... Agora, rumo ao fim, calejadas e mais fortes, venceremos juntas.

Ao Prof. e orientador Jacinto Costa, um exemplo de dedicação e competência.

Às médicas do HC/UFPE Isabel Castro e Mariléa Guimarães, pela generosidade do seu apoio durante o desenvolvimento deste trabalho, além de transmitirem muito conhecimento.

Aos professores da POSPAT, pela contribuição fundamental para a nossa formação.

À Margarete Valdevino, sempre disposta a ajudar em tudo o que foi preciso, com carinho e tranquilidade.

À Silvana Paes, pela sua importante contribuição na parte técnica histológica.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares (LPCM) e Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE) pela contribuição e companheirismo.

Ao Prof. Antônio Carlos de Freitas, pela colaboração e co-orientação deste trabalho.

À Ricela Souza, residente em Anatomia Patológica do HC/UFPE, pela sua contribuição na etapa de resgate e revisão dos casos e diagnósticos.

Aos membros da banca de defesa, pela disponibilidade em contribuir para qualificação deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento através da concessão de bolsa de estudo.

“O coração do homem traça o seu caminho, mas
o SENHOR lhe dirige os passos.
(...) Quanto melhor é adquirir a sabedoria do que
o ouro! E mais excelente, adquirir a prudência do
que a prata!”

Provérbios 16:9,16
(Bíblia Sagrada - Almeida Revista e Atualizada)

Resumo

O câncer do colo uterino é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres mundialmente, e o sétimo no geral. No Brasil, esta neoplasia é a terceira mais frequente no gênero feminino, com mais de 15 mil casos novos a cada ano. A infecção persistente pelo papilomavírus humano dos tipos de alto risco oncogênico está associada ao câncer cervical, porém uma pequena percentagem de mulheres infectadas por estes vírus desenvolve lesões pré-malignas que podem evoluir à invasão. Portanto, outros cofatores são necessários para a persistência viral que, após 2 anos sem intervenção, leva à expressão desregulada e concomitante das oncoproteínas transformantes E6 e E7. As enzimas degradadoras de matriz extracelular conhecidas como metaloproteinases da matriz tem sido extensamente estudadas devido ao seu papel na invasão, metástase, angiogênese e recidiva tumoral. Nas lesões cervicais, um aumento na expressão das metaloproteinases foi identificado, porém, seu papel na progressão das lesões pré-invasivas e sua interação com a infecção pelo papilomavírus ainda não está bem esclarecida. Neste intuito, o presente estudo visou avaliar, através de técnica imuno-histoquímica, a associação dos níveis de expressão das metaloproteinases da matriz 2 e 9 com os graus de lesões cervicais. Para isso, foram utilizadas amostras de biopsias parafinadas, diagnosticadas e arquivadas entre 2011 e 2015 no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas de Recife, Pernambuco, Brasil, incluindo 115 biopsias de lesões cervicais, obtidas por conização, bem como 14 casos de tecidos cervicais sem lesão. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram um aumento da expressão das metaloproteinases 2 e 9 nos casos de invasão em relação a condições pré-malignas, tanto no citoplasma quanto no núcleo de células epiteliais escamosas, sendo a intensidade da expressão nuclear das metaloproteinases estudadas mais significativa nas células cancerosas. Também foi observada diminuição da expressão das metaloproteinases 2 e 9 no citoplasma das células glandulares adjacentes na presença do carcinoma escamoso invasor, quando comparadas ao controle. Mais estudos precisam ser realizados para avaliar o valor prognóstico das metaloproteinases 2 e 9 nas condições pré-malignas e malignas do colo uterino.

Palavras-chave: Metaloproteinases da Matriz. Papilomavírus Humano. Neoplasias do Colo Uterino.

Abstract

The cervical cancer is the fourth most common cancer among women worldwide, and seventh overall. In Brazil, this cancer is the third most common in women, with more than 15,000 new cases each year. Persistent infection with human papillomavirus types of high oncogenic risk is associated with cervical cancer, but a small percentage of women infected by these viruses develop precancerous lesions that may progress to invasion. Therefore, other cofactors are required for viral persistence which, after 2 years without intervention, leads to unregulated and concomitant expression of transformants E6 and E7 oncoproteins. The extracellular matrix degrading enzymes known as matrix metalloproteinases has been extensively studied because of its role in invasion, metastasis, angiogenesis and tumor recurrence. In cervical lesions, an increase in the expression of metalloproteinases was identified, however, its role in the progression of pre-invasive lesions and their interaction with the papillomavirus infection is not well understood. To this end, the present study evaluated, through immunohistochemical technique, the association of the expression levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 with grades of cervical lesions. For this, we used paraffined biopsy samples, diagnosed and filed between 2011 and 2015 at the Pathology Laboratory of the Hospital das Clínicas of Recife, Pernambuco, Brazil, including 115 biopsies of cervical lesions, obtained by conization, and 14 cases of tissues without cervical injury. The results of this study demonstrated an increased expression of metalloproteinases 2 and 9 in invasion compared to pre-malignant conditions, in both cytoplasm and nucleus of squamous epithelial cells, and a more significant intensity of the nuclear expression of metalloproteinases studied in cancer cells. It was also observed decreased expression of metalloproteinases 2 and 9 in the cytoplasm of adjacent glandular cells in the presence of invasive squamous cell carcinoma, when compared to control. More studies are needed to assess the prognostic value of metalloproteinases 2 and 9 in premalignant and malignant conditions of the cervix.

Keywords: Matrix Metalloproteinases. Papillomaviridae. Uterine Cervical Neoplasms.

Lista de ilustrações

Figura 1. O ciclo viral e a transformação neoplásica induzida pelo HPV.	15
Figura 2. Domínios estruturais das classes de MMPs.	19
Figura 3. Ativação de pró-MMPs e inibição por TIMPs.	21
Figura 4. Expressão de metaloproteinases da matriz (MMPs) e seus inibidores tissulares (TIMPs) nas interações tumor-estroma.	22
Tabela 1. Classificação estrutural das MMPs.	18
Tabela 2. Expressão imuno-histoquímica da MMP-2 e MMP-9 em tecidos cervicais uterinos.	25

Lista de abreviaturas e siglas

Item	Definição em Português	Definição em Inglês
AGC	Células glandulares atípicas	<i>Atypical glandular cells</i>
ASC-H	Células escamosas atípicas não podendo excluir lesão de alto grau	<i>Atypical squamous cells cannot exclude HSIL</i>
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado	<i>Atypical squamous cells of undetermined significance</i>
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico	<i>basic-Fibroblast growth factor</i>
BSA	Albumina sérica bovina	<i>Bovine serum albumin</i>
CC	Câncer cervical ou câncer de colo do útero	
DAB	Diaminobenzidina (cromógeno)	
DNA	Ácido desoxirribonucleico	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
E1, E2, E4, E5, E6 e E7	Proteínas precoces do HPV (1, 2, 4, 5, 6 e 7)	<i>HPV Early proteins (1, 2, 4, 5, 6 and 7)</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio	
HPV	Papilomavírus humano	<i>Human Papillomavirus</i>
HSIL	Lesão Intraepitelial de Alto Grau	<i>High-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>
IHQ	Imuno-histoquímica	
L1 e L2	Proteínas tardias do HPV (1 e 2)	<i>HPV Late proteins (1 and 2)</i>
LCR	Região de controle longa	<i>Long Control Region</i>
LSIL	Lesão Intraepitelial de Baixo Grau	<i>Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>
MB	Membrana basal	
MEC	Matriz extracelular	
MMP	Metaloproteinase da matriz	<i>Matrix Metalloproteinase</i>

MT-MMP	Metaloproteinase da matriz do tipo membrana	<i>Membrane-type Matrix Metalloproteinase</i>
NIC (I, II e III)	Neoplasia intraepitelial cervical (de grau I, II e III)	
ORF	Fases de leitura aberta	<i>Open Reading Frames</i>
p16 ^{INK4a}	Proteína inibidora de quinase 4 dependente de ciclina (de massa 16 kDa)	<i>Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor protein</i>
p53	Proteína de massa de 53 kda, supressora de tumor	
PBS	Tampão fosfato salino	<i>Phosphate-buffered saline</i>
pRb	Proteína associada ao retinoblastoma, supressora de tumor	
Pró-MMP	Pró-metaloproteinase da matriz, MMP inativa, contendo o domínio pró-peptídeo	
RECK		<i>Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs</i>
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
SH	Grupo sulfidril ou tiol	
TEM	Transição epitélio-mesenquimal	
TGF-β	Fator transformador do crescimento beta	<i>Transforming growth factor-beta</i>
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinases	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Zn ²⁺	Íon zinco	

Sumário

1 Apresentação	12
2 Revisão da Literatura	14
2.1 O papilomavírus humano e seu ciclo	14
2.2 O papilomavírus humano e a transformação neoplásica	15
2.3 Progressão das lesões cervicais	16
2.4 Metaloproteinases da matriz	17
2.5 Expressão das metaloproteinases da matriz na progressão tumoral	21
2.5.1 Metaloproteinases da matriz 2 e 9 na progressão de lesões cervicais	23
3 Objetivos	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 Métodos	28
4.1 Tipo de estudo	28
4.2 Grupo de estudo	28
4.3 Aspectos éticos	28
4.4 Imunohistoquímica para MMP-2 e MMP-9	28
4.5 Análise estatística	30
5 EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 E 9 NAS LESÕES PRÉ-MALIGNAS E MALIGNAS DA CÉRVIX UTERINA	31
6 Conclusões	45
Referências	46
Anexo A – Parecer do CEP/CCS/UFPE	53

1 Apresentação

O câncer de colo do útero ou câncer cervical (CC) é um importante problema de saúde pública, configurando o quarto tipo de neoplasia maligna mundialmente mais comum entre as mulheres e o sétimo na população em geral. A ocorrência de CC foi estimada em 528.000 casos novos a cada ano, e a causa de 266.000 óbitos em 2012 (FERLAY *et al.*, 2013).

Cerca de 85% dos casos ocorre em regiões menos desenvolvidas, como em países da África Subsaariana, onde é o principal câncer que acomete a população feminina (BRAY *et al.*, 2013). No Brasil, esta neoplasia é a terceira mais frequente em mulheres, sem considerar os tumores de pele não melanoma, e 15.590 novos casos foram estimados para 2014 (INCA, 2014).

O Papilomavírus humano (HPV, do inglês, *Human Papillomavirus*) é o agente etiológico mais comum das doenças sexualmente transmissíveis. Os tipos de HPV de alto risco oncogênico são os principais fatores para o desenvolvimento do CC (ZUR HAUSEN, 2002).

O número de infecções pelo HPV de alto risco é da ordem de milhões (DE SANJOSÉ *et al.*, 2007; DUNNE *et al.*, 2007), contudo, apenas uma pequena percentagem progride a lesões que podem chegar à invasão (INSINGA *et al.*, 2005).

Embora perspectivas de redução destas taxas tenham emergido com a implementação das campanhas de vacinação contra os principais HPVs oncogênicos em alguns países (MARKOWITZ *et al.*, 2012), permanecem incertezas em relação ao nível de proteção através das vacinas em longo prazo. Além disso, haverá um período de transição com grupos remanescentes não vacináveis, sendo necessárias diferentes estratégias para o controle do CC (LYNGE *et al.*, 2009; TOTA *et al.*, 2014).

Sabe-se que a integração do DNA viral é uma etapa chave para a carcinogênese cervical, devido à inibição de genes supressores de tumor e alterações do ciclo celular produzidas pela expressão dos genes virais E6 e E7 nas células do hospedeiro (MÜNGER; HOWLEY, 2002).

Lesões intraepiteliais (pré-malignas), quando não tratadas, podem progredir a lesões invasivas (malignas). As alterações dessas lesões podem ser detectadas pelo exame citológico (Papanicolau) e confirmadas pelo exame histológico.

Apesar do progresso no rastreamento de mulheres com doença cervical, um elevado número de resultados falso-negativos e falso-positivos é observado (DEHN *et al.*, 2007;

HWANG, SHROYER, 2012), além de haver controvérsias em relação ao manejo das pacientes com lesões pré-invasivas (PETRY, 2011; MASSAD *et al.*, 2013). Isso evidencia a necessidade de se identificar biomarcadores clinicamente úteis para aumentar a precisão do diagnóstico e fornecer informações quanto ao risco de progressão para uma lesão mais severa.

A família das metaloproteínases da matriz (MMPs, do inglês, *Matrix Metalloproteinases*) tem sido explorada como importante ferramenta na detecção precoce, prognóstico e metástase em diversos cânceres humanos. Essas proteases são capazes de degradar os componentes da matriz extracelular (MEC) e membrana basal (MB), além de possuírem função na modulação da adesão celular, na regulação de fatores de crescimento e seus receptores, de citocinas e quimiocinas, na angiogênese e na transição epitélio-mesenquimal (TEM), uma característica marcadora de metástase na progressão tumoral (ROY *et al.*, 2009).

As MMPs tem sua secreção e ativação aumentadas durante a progressão tumoral, sendo produzidas pelas próprias células do tumor ou estromais, tais como os fibroblastos e macrófagos (STERNLICHT *et al.*, 2000; STETLER-STEVENSON, 2008).

Numerosos estudos apóiam a possibilidade de que a superexpressão de MMPs promova crescimento tumoral e metástase no carcinoma do colo uterino (LIBRA *et al.*, 2009). Uma apreciação de como essas enzimas estão ligadas ao desenvolvimento e progressão do câncer pode melhorar as estratégias diagnósticas e terapêuticas.

Portanto, o presente estudo visou investigar a expressão das MMPs 2 e 9, através de imuno-histoquímica (IHQ), em diferentes graus de lesões e em tecidos cervicais na ausência de lesão, na tentativa de associar a intensidade de expressão das MMPs 2 e 9 com os diagnósticos histológicos dos casos.

2 Revisão da Literatura

2.1 O papilomavírus humano e seu ciclo

Mais de 180 tipos de HPV foram descritos (BERNARD *et al.*, 2010) e cerca de 40 cepas infectam o trato ano-genital (DE VILLIERS *et al.*, 2004), sendo comumente classificados em grupos de baixo e alto risco (ZUR HAUSEN, 2002), de provável alto risco e de risco indeterminado, de acordo com o seu potencial oncogênico (MUÑOZ *et al.*, 2003).

Os papilomavírus humanos 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 8.000 pares de bases e está dividido em uma região codificante, com oito fases de leitura aberta (ORF, do inglês, *Open Reading Frames*) que codificam as proteínas precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7, do inglês, *Early*) e as proteínas tardias (L1 e L2, do inglês, *Late*), e outra região não codificante chamada LCR (do inglês, *Long Control Region*), implicada no controle da replicação do DNA viral e da transcrição dos genes virais (ZUR HAUSEN, 1999).

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

A multiplicação do genoma viral nas células-tronco é limitada, sob o controle das proteínas precoces E1 e E2 do HPV, sendo produzidas de 50 a 100 cópias do DNA viral por célula. Esta é uma fase do ciclo de multiplicação chamada de não produtiva, por não haver produção de vírions. Conforme acontecem divisões celulares, segue-se uma fase de conservação dos genomas virais na camada basal e parabasal do epitélio (ZUR HAUSEN, 1996; DOORBAR, 2005).

Os genomas do HPV novamente sintetizados se distribuem em cada célula filha, e à medida que as células epiteliais se diferenciam, há uma amplificação do DNA viral. Quando fatores implicados na diferenciação celular ativam a transcrição dos genes tardios, ocorre a expressão das proteínas L1 e L2 nas camadas mais superficiais do epitélio, permitindo a formação da cápsula do genoma viral. Os novos vírions infectantes finalmente são liberados no meio exterior com as células descamativas, completando o ciclo do vírus (ZUR HAUSEN, 1996; DOORBAR, 2005) (Figura 1).

supressora tumoral de 53 kDa conhecida como p53, enquanto o produto de E7 promove a degradação da proteína associada ao retinoblastoma (pRb) (SCHFFNER *et al.*, 1993; GIARRE *et al.* 2001). A inativação da pRb resulta na super-expressão da proteína inibidora de quinase 4 (p16^{INK4a}), uma reguladora da divisão celular, em função de um feedback negativo. Estudos mostram que a super-expressão da proteína p16^{INK4A} pode ser utilizada para estimar a evolução e extensão da lesão e auxiliar na diminuição das variações interobservadores (RAJCÁNI *et al.*, 2009; BERGERON *et al.*, 2010; MISSAOUI *et al.*, 2010).

A infecção persistente por HPVs de alto risco, após 2 anos, resulta na expressão de E6 e E7. Se não houver intervenção, haverá integração do DNA viral ao DNA do hospedeiro, iniciando-se a transformação carcinogênica entre 15 e 20 anos (PITTAYAKHAJONWUT; ANGELETTI, 2010).

Contudo, a integração viral 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).

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. Infecção por HPV de alto risco resulta em progressão para CC apenas em uma pequena percentagem de mulheres, após um longo período de latência (ZUR HAUSEN, 1996; HO *et al.*, 1998).

2.3 Progressão das lesões cervicais

As lesões pré-malignas da cérvix uterina são denominadas na histologia pelo termo Neoplasias Intraepiteliais Cervicais, que podem ser de grau I, II ou III (NIC I, II ou III), além do carcinoma *in situ*, que equivale à NIC III e é o último estágio da pré-invasão. Na citologia, são utilizados os termos Lesão Intraepitelial de Baixo Grau (LSIL, correspondendo à NIC I) ou Lesão Intraepitelial de Alto Grau (HSIL, compreendendo NIC II e III). A lesão maligna é o carcinoma escamoso invasor, que no caso das lesões glandulares, é denominada de adenocarcinoma invasor, sendo utilizado o termo adenocarcinoma *in situ* em referência à fase pré-invasiva (SOLOMON, 2002).

Na citologia, utilizando-se a classificação o Sistema Bethesda (SOLOMON, 2002), também é possível detectar e descrever alterações muito sutis denominadas de Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), que podem refletir alterações transitórias ou iniciais e podem evoluir a lesões intraepiteliais, e as Células escamosas atípicas não podendo excluir lesão de alto grau (ASC-H). A descrição de Células glandulares atípicas (AGC) é igualmente importante, com possibilidade de estar associada a lesões de alto grau subjacentes, sejam glandulares ou escamosas.

Muitas mulheres portadoras do HPV, mesmo dos tipos oncogênicos, não desenvolvem doença ou desenvolvem lesões que regredem ou se estabilizam em estágios pré-invasivos (HO *et al.*, 1998; ZUR HAUSEN, 1999; STEBEN; DUARTE-FRANCO, 2007). Estima-se que, se não tratados, cerca de 5% dos casos de NIC II e de 12% a 31% de NIC III irão progredir para carcinoma invasivo (OSTÖR, 1993; MCCREDIE *et al.*, 2008).

A transição de um crescimento neoplásico *in situ* para câncer invasivo e metastático envolve diversos eventos decorrentes de interações cruzadas entre células neoplásicas e do estroma no microambiente tumoral, permitindo a sobrevivência, proliferação e migração celular (MILES; SIKES, 2014). Portanto, uma melhor compreensão acerca dos mecanismos moleculares que podem tornar as células de lesões intraepiteliais cervicais capazes de invadir o estroma adjacente e metastatizar teria grande importância clínica.

2.4 Metaloproteinases da matriz

Invasão tumoral e metástase envolvem a degradação da membrana basal (MB) e remodelação da matriz extracelular (MEC), que funcionam como barreiras teciduais ao crescimento invasivo. Dentre diversas enzimas capazes de digerir esta matriz protéica, grande destaque é conferido à família das metaloproteinases de matriz (MMPs).

As MMPs pertencem a uma família de endopeptidases zinco-dependentes com capacidade de degradar uma ampla variedade de substratos dentre os principais componentes da MEC e MB, além de moléculas da superfície celular e outras proteínas pericelulares (STERNLICHT; WERB, 2001). São, portanto, integrantes fundamentais no processo de progressão das lesões tumorais.

A ação de MMPs foi mostrada pela primeira vez por Gross e Lapiere (1962), que observaram enzimas capazes de degradar géis de colágeno fibrilar da cauda involutiva de girinos, posteriormente denominadas de collagenases.

Foram identificadas 23 MMPs humanas e homólogos de outras espécies (NAGASE *et al.*, 2006; BONNANS *et al.*, 2014). Historicamente, as MMPs foram classificadas com base na especificidade de seu substrato, sendo divididas em collagenases, gelatinases, estromelisinases e semelhantes à estromelisinase, matrilisinas, MMPs do tipo membrana (MT-MMPs) e outras. No entanto, com a extensão da lista de substratos, um sistema de numeração sequencial foi adaptado, agrupando as MMPs de acordo com sua estrutura em oito classes distintas: cinco são secretadas e três são MT-MMPs (EGEBLAD; WERB, 2002) (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação estrutural das MMPs.

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

Fonte: Adaptado de Egeblad e Werb (2002).

Nota: GPI - glicofosfatidilinositol. *MMPs sem designação sequencial.

Em geral, seus elementos estruturais incluem uma sequência sinalizadora N-terminal (pré-domínio) que direciona ao retículo endoplasmático, sendo então removida; um domínio pró-peptídico, que mantém a latência da enzima; um domínio catalítico contendo um sítio de ligação do íon zinco (Zn^{2+}); uma região de articulação ou ligação e um domínio de repetições semelhantes à hemopexina (STERNLICHT; WERB, 2001) (Figura 2).

Fatores de crescimento, hormônios, citocinas e oncogenes regulam a transcrição dessas enzimas, que são sintetizadas como zimogênios inativos (pró-MMPs). As pró-MMPs são mantidas inativas pela interação entre um grupo sulfidríla ou tiol (SH) de cisteína não pareado, próximo à extremidade C-terminal do domínio pró-peptídeo, e o íon zinco no domínio catalítico. A ativação requer a abertura deste “interruptor” por remoção proteolítica do domínio pró-peptídeo ou por perturbação ectópica da ligação entre cisteína e zinco. Uma vez deslocado, o grupo tiol é substituído por uma molécula de água que se liga ao zinco, permitindo a ação de clivagem das ligações peptídicas dos alvos da MMP (STERNLICHT; WERB, 2001).

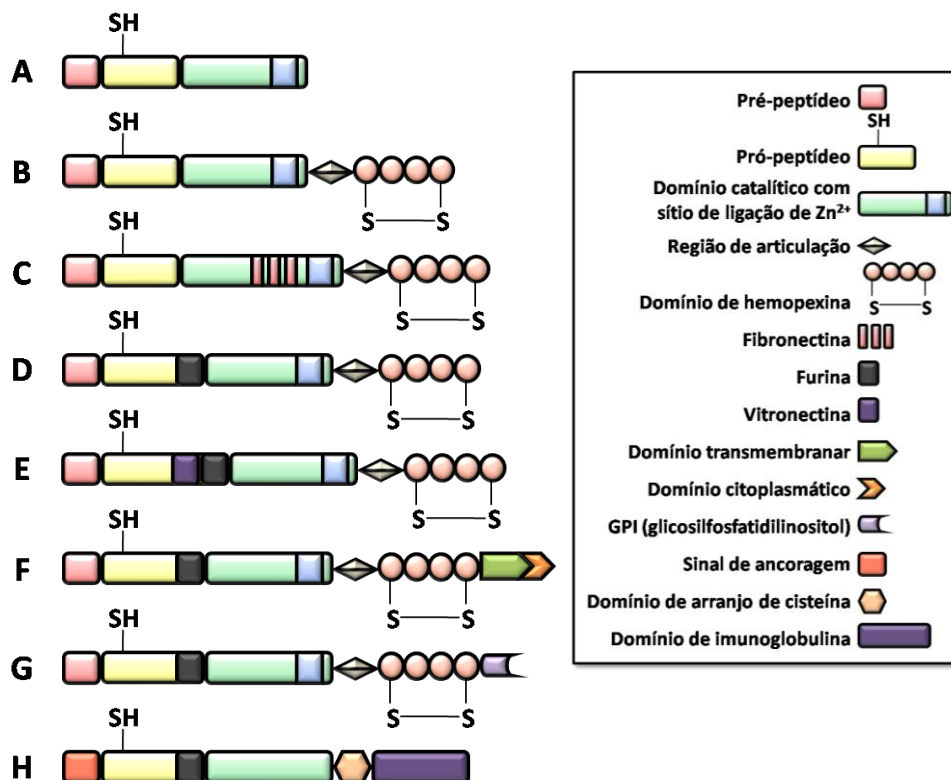


Figura 2 – Domínios estruturais das classes de MMPs.
Fonte: Adaptado de Egeblad e Werb (2002).

A maioria das MMPs é ativada no exterior da célula por outras MMPs já ativadas ou serina proteases, como a plasmina (WOESSNER; NAGASE, 2000). MMP-11, MMP-28, MT-

MMPs e MMP-23 possuem um motivo de reconhecimento por serina-proteases semelhantes à furina, permitindo sua ativação intracelularmente antes de atingirem a superfície celular ou ser secretadas (STERNLICHT; WERB, 2001).

A atividade proteolítica das MMPs também é precisamente controlada, em condições normais, através da ação dos inibidores endógenos presentes no plasma, como α 2-macroglobulina e trombospondina-1 e 2, inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs, *Tissue inhibitors of metalloproteinases*) e pequenas moléculas com domínios semelhante à TIMP (revisado em Egeblad; Werb, 2002). A proteína RECK (*Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs*), ligada à membrana, também foi identificada como capaz de regular negativamente MMP-2, 9 e 14 (FURUMOTO *et al.*, 2001; OH *et al.*, 2001; DONG *et al.*, 2010).

Foram descritos quatro TIMPs (TIMP-1, 2, 3 e 4), que inibem reversivelmente as MMPs em proporção molar estequiométrica de 1:1 e diferem na expressão tecidual específica e capacidade para inibir várias MMPs (EGEBLAD; WERB, 2002; NAGASE *et al.*, 2006). TIMP 1, 2 e 4 são secretados e TIMP-3 está ancorado na MEC (KHOKA *et al.*, 2013).

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).

A ativação da MMP secretada como pró-MMP-2 é mediada por um complexo de superfície celular constituído por um homodímero de MMP-14 (MT1-MMP), bem como uma molécula de TIMP-2 (Figura 3). TIMP-2 liga-se ao domínio catalítico de uma das moléculas de MMP-14 em dímero e ao domínio hemopexina da pró-MMP-2, facilitando a clivagem e ativação da pró-MMP-2 pela segunda molécula do dímero de MT1-MMP, livre de TIMP-2 (BUTLER *et al.*, 1998; ITOH *et al.*, 2001; NAGASE *et al.*, 2006).

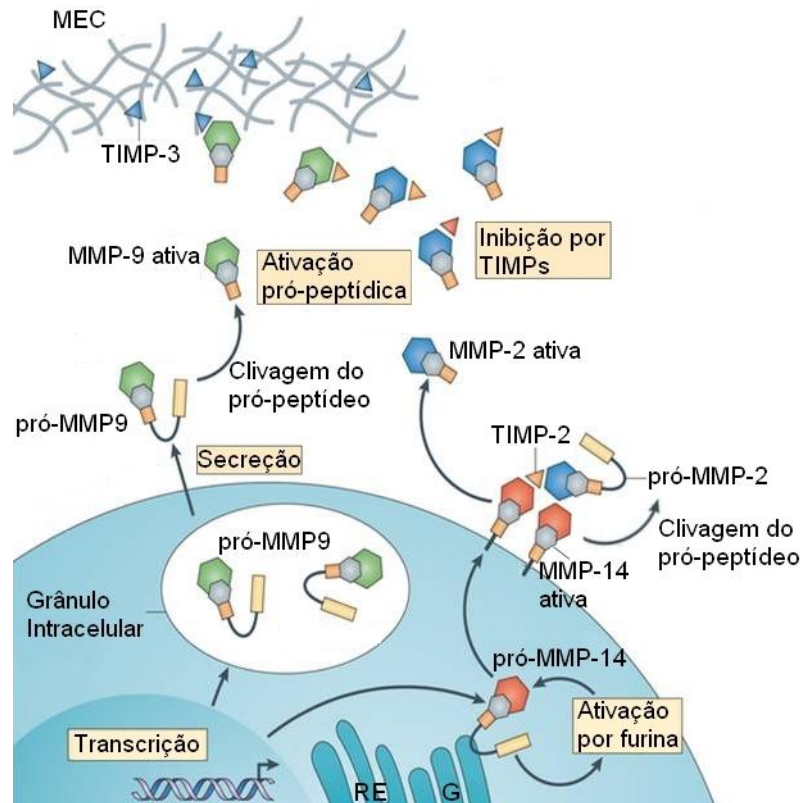


Figura 3 – Ativação de pró-MMPs e inibição por TIMPs.

Fonte: Adaptado de Khoka *et al.* (2013).

Nota: RE – retículo endoplasmático; G – complexo de Golgi.

A ação das MMPs na degradação e remodelação da MEC é essencial em processos fisiológicos como desenvolvimento embrionário, morfogênese, reprodução, reabsorção e remodelação tecidual. Expressão desregulada de MMPs devido ao desequilíbrio entre sua ativação e inibição é observada em doenças inflamatórias, na fibrose e no câncer (NAGASE *et al.*, 2006).

2.5 Expressão das metaloproteínases da matriz na progressão tumoral

A expressão e ativação das MMPs está aumentada em quase todos cânceres humanos em comparação com o tecido normal (EGEBLAD; WERB, 2002; ROY *et al.*, 2009). Inicialmente acreditou-se que apenas as células cancerígenas eram responsáveis pela produção desregulada de MMPs.

Contudo, influências recíprocas entre células do tumor e do estroma circundante promovem a progressão tumoral (Figura 4). Células neoplásicas produzem diversas citocinas, quimiocinas e enzimas que ativam fibroblastos e células estromais, que em resposta secretam proteases, incluindo as MMPs (MILES; SIKES, 2014).

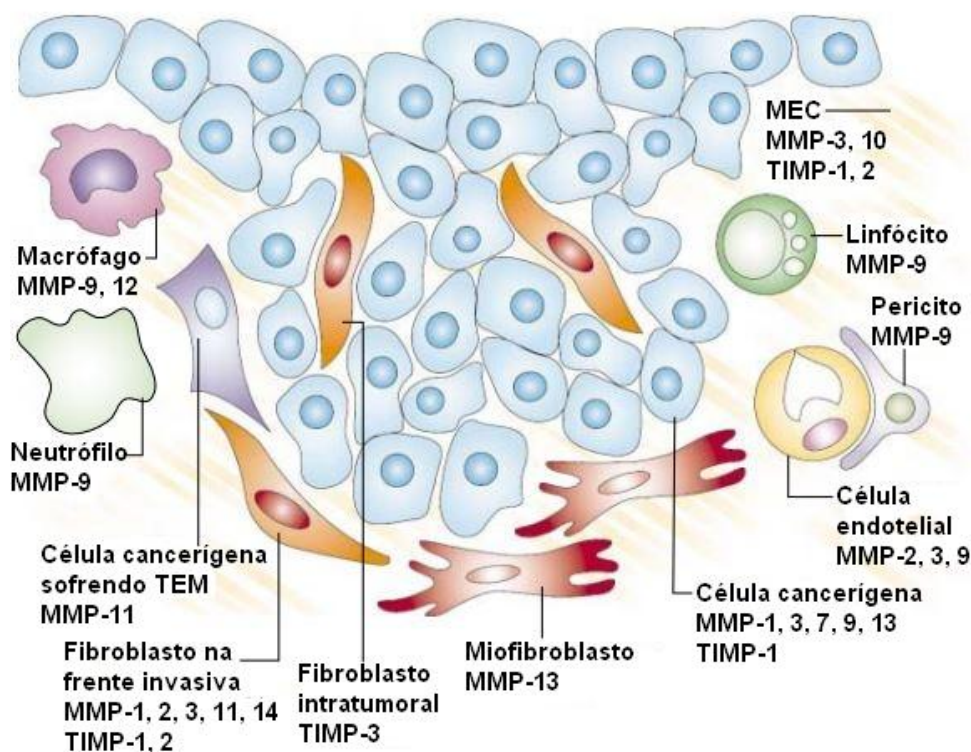


Figura 4 – Expressão de metaloproteínases da matriz (MMPs) e seus inibidores tissulares (TIMPs) nas interações tumor-estroma. A progressão tumoral se dá através de uma comunicação recíproca entre as células tumorais e do estroma, que depende das vias de sinalização reguladas pelos diversos componentes da MEC, resultando, em última instância, no crescimento do tumor, sobrevivência celular e colonização de sítios metastáticos. Diferentes MMPs e TIMPs são sintetizados pelas células cancerígenas, células cancerígenas submetidas a transição epitélio-mesênquimal (TEM) e células estromais, incluindo fibroblastos, células endoteliais e inflamatórias, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos. O conjunto singular de MMPs e TIMPs expressos no estroma tumoral varia com o tipo e estágio do tumor.

Fonte: Adaptado de Egeblad e Werb (2002).

Através de hibridização *in situ*, RNAm de várias MMPs (MMP-1, 2, 3, 11 e 14) foi identificado em fibroblastos do estroma, especialmente próximo às células invasoras, mas não nas células tumorais em cânceres humanos de mama, pulmão, próstata, ovário e colorretal. Já a MMP-9 foi identificada principalmente em células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos em câncer colorretal (ZUCKER *et al.*, 1999).

As proteínas MMP-2 e MMP-9, por sua vez, foram localizadas na superfície de células cancerosas, indicando que estas MMPs de origem estromal são recrutadas para a membrana da célula tumoral, se ligando a receptores celulares (POLETTE, M. *et al.*, 1994; BROOKS *et al.*, 1996; OLSON *et al.*, 1998).

A MEC serve como arcabouço de sustentação e reservatório de fatores de crescimento, que são liberados quando ocorre a digestão e alteração dos componentes da matriz (MILES; SIKES, 2014). 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 e vigilância imunológica (EGEBLAD; WERB, 2002).

As células normais dependem da ancoragem e dos sinais gerados pelas moléculas de adesão para sua sobrevivência, crescimento e proliferação de maneira adequada; o rompimento desencadeia o processo de morte celular programada denominado de *anoikis*.

A transformação epitélio-mesenquimal (TEM) é um processo de aquisição de características migratórias implicado no surgimento de células tumorais metastáticas. MMP-3 e MMP-7 podem clivar E-caderina, principal molécula de adesão célula-célula em epitélio, levando a aumento na migração. TEM pode ser induzida por MMP-28 através da ativação proteolítica de fator transformador do crescimento beta (TGF- β) (ROY *et al.*, 2009).

MMPs possuem papel dual no processo de angiogênese, estando envolvidas tanto no início como no crescimento e manutenção do leito vascular. Essas enzimas são essenciais para a remodelação da MEC durante a angiogênese, bem como são responsáveis pela liberação de fatores pró-angiogênicos ligados à MEC ou pela sinalização intracelular via integrinas. A MMP-9 libera importantes fatores angiogênicos como o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). MMP-2 e MMP-14 também participam da angiogênese, assim como MMP-1 e MMP-7 em menor grau. Todavia, a clivagem de plasminogênio e colágeno XVIII por MMPs produz angiostatina e endostatina, respectivamente, que são inibidores endógenos de angiogênese (ROY *et al.*, 2009; YADAV *et al.*, 2014).

MMPs podem modular imunidade e inflamação, uma vez que clivam diversas citocinas, receptores de citocinas e quimiocinas, moléculas sinalizadoras da inflamação. Níveis aumentados de MMP-9 no infiltrado células inflamatórias em câncer de mama demonstram haver participação desta MMP em inflamação associada a tumor (ROY *et al.*, 2009).

2.5.1 Metaloproteinases da matriz 2 e 9 na progressão de lesões cervicais

A expressão de MMPs tem sido alvo de diversos estudos relacionados à carcinogênese cervical uterina. Expressão aumentada de MMP-2, MMP-9 e MMP-14 tem sido observada durante a progressão do carcinoma cervical. Além disso, seu envolvimento no processo de invasão tumoral, metástase e recidiva do tumor foi descrito (SHEU *et al.*, 2003; GAIOTTO *et al.*, 2004; ZHAI *et al.*, 2005).

Grande importância tem sido conferida ao papel no processo de invasão da MMP-2 e MMP-9, sendo denominadas collagenases tipo IV devido sua capacidade seletiva de degradar este tipo de colágeno abundante na MB (LIBRA *et al.*, 2009).

Estas MMPs digerem gelatinas (colágeno desnaturado) rapidamente com a ajuda das três repetições de fibronectina de tipo II que se liga à gelatina/colágeno (NAGASE *et al.*, 2006). Uma ação coordenada durante o crescimento tumoral foi descrita, iniciada pela degeneração de colágeno I em gelatina pela MMP-14, que é posteriormente degradada pela MMP-2, sendo esta atividade dependente da concentração de TIMP-2 (SATO; TAKINO, 2010).

MMP-2 também digere colágenos I, II e III semelhantemente a collagenases, porém sua atividade collagenolítica é mais razoável na região pericelular do que em solução, quando comparada à MMP-1, uma vez que sua forma inativa é recrutada à superfície celular na ativação por MT-MMPs (NAGASE *et al.*, 2006).

Através de técnica imuno-histoquímica, foi demonstrada expressão destas enzimas em lesões cervicais pré-malignas e invasivas. Alguns estudos e seus principais resultados estão resumidos na Tabela 2 e destacam um aumento na expressão tecidual de MMP-2 e MMP-9 nos casos de câncer e de lesões intraepiteliais de alto grau.

Analisando RNAm de MMP-2 em amostras cervicais, Wang *et al.* (2008) encontraram que a expressão foi, em geral, maior nas áreas de invasão do que no tecido normal equivalente. No mesmo estudo, a detecção imuno-histoquímica de MMP-2 em CCs apresentou associação significativa com invasão do paramétrio e metástase em linfonodos, mas não com recorrência ou sobrevivência.

Através de zimografia, observou-se que os níveis de MMP-9 foram significativamente maiores em HSIL e CC do que em cérvix normal, e que houve aumento progressivo da MMP-2 ativa de HSIL à CC de fase I e estágios mais avançados. Além disso, a atividade da MMP-9 e a forma ativa de MMP-2 em CC foram fortemente correlacionadas com a permeação linfática e metástases linfonodais (SHEU *et al.*, 2003).

Estudos *in vitro* sobre a atividade das gelatinases em linhagens de câncer cervical (incluindo HeLA, Caski, SiHa e C-33A) identificaram apenas a forma latente de MMP-2 (ZHAI *et al.*, 2005; SCHRÖPFER *et al.*, 2010), não tendo sido possível detectar MMP-9 (SCHRÖPFER *et al.*, 2010). A pró-MMP-2 também foi detectada em linhagens derivadas de NIC 1 e de queratinócitos não transformados imortalizados por HPV-16 e -18 (ZHAI *et al.*, 2005).

Tabela 2 – Expressão imuno-histoquímica da MMP-2 e MMP-9 em tecidos cervicais uterinos.

MMP	Normal*	LSIL	HSIL	CC	Observação	Autor
MMP-2	+	+	++	++	Expressão intensa em células basais do tumor (75%) e do estroma (80%) no CC.	Asha <i>et al.</i> (2003)
	-	-	-	++	Expressão difusa no estroma, mais intensa ao redor do ninho de células cancerosas.	Minami <i>et al.</i> (2003)
	Ø	+	++	++	Expressão moderada em HSIL (13%) e moderada à forte em CC (48%).	Sheu <i>et al.</i> (2003)
	-	-	++	++	Expressão moderada à forte na IEE de NIC III, intensa em SCC-NK e difusa nas células tumorais de SCC-K.	Malina <i>et al.</i> (2004)
	+	+	++	++	Houve uma relação linear entre o aumento do grau e a intensidade da expressão.	Branca <i>et al.</i> (2006)
	Ø	Ø	Ø	++	Co-expressão de MMP-2 e -14 em CC foi associada à infecção pelo HPV-16.	Kaewprag <i>et al.</i> (2012)
MMP-9	+	+	++	++	Expressão intensa em células basais do tumor (90%) e do estroma (85%) no CC.	Asha <i>et al.</i> (2003)
	Ø	+	++	++	Expressão moderada na maioria dos casos de HSIL (83%) e CC (84%).	Sheu <i>et al.</i> (2003)
	Ø	-	++	Ø	Expressão no infiltrado estromal de NIC III.	Schröer <i>et al.</i> (2011)

Legenda: - (ausência de expressão em todos os casos); + (expressão fraca ou ausente no grupo); ++ (expressão moderada à intensa); Ø (não houve casos); CC (câncer cervical); HSIL (Lesão Intraepitelial de Alto Grau); IEE (interface epitélio-estromal); LSIL (Lesão Intraepitelial de Baixo Grau); MB (membrana basal); NIC III (Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau III, corresponde a uma HSIL); SCC-K (Carcinoma cervical queratinizante); SCC-NK (Carcinoma cervical não-queratinizante). Nota: *Tecido negativo para NIC.

Fonte: Autora.

Poucos estudos avaliaram a interação entre a infecção pelo HPV e a expressão e atividade de diferentes MMPs e seus reguladores na carcinogênese cervical. As oncoproteínas E5, E6 e E7 do HPV são os fatores virais primários responsáveis pela iniciação e progressão do CC (MOODY; LAIMINS, 2010).

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

Akgül *et al.* (2011) observaram que E2 de HPV-18 elevou a expressão de MMP-9 pela ativação direta do seu promotor.

Portanto, a literatura demonstra que as MMPs podem estar envolvidas na progressão das lesões cervicais em mulheres portadoras da infecção pelo HPV. Uma apreciação de como essas enzimas estão ligadas à carcinogênese cervical pode melhorar as estratégias diagnósticas e terapêuticas, e ainda fornecer informações quanto ao risco de progressão das lesões pré-invasivas.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Investigar a associação da expressão das MMPs 2 e 9, através de imuno-histoquímica (IHQ), com os graus de lesões cervicais.

3.2 Objetivos específicos

- Conhecer os níveis de expressão por IHQ das MMPs 2 e 9 em diferentes graus de lesões cervicais e em tecidos cervicais na ausência de lesão;
- Investigar associação entre a intensidade de expressão das MMPs 2 e 9 e os diagnósticos histológicos dos casos.

4 Métodos

4.1 Tipo de estudo

O estudo foi realizado através do método observacional, analítico transversal.

4.2 Grupo de estudo

Foram avaliadas as fichas dos diagnósticos histopatológicos de biopsias do colo uterino obtidas por procedimento cirúrgico de conização, entre 2011 e 2015, arquivados no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas de Recife, Pernambuco, Brasil. Foram selecionados os casos com diagnóstico positivo para NIC e/ou carcinoma escamoso invasor. Foram excluídos os casos para os quais não foi possível localizar o(s) bloco(s) ou lâmina(s) referente(s) para confirmação do diagnóstico.

O total de 114 casos de cones de lesões cervicais uterinas emblocadas em parafina foi utilizado. Os casos foram divididos, de acordo com o diagnóstico histopatológico, nos seguintes grupos: NIC I (8), NIC II (30), NIC III (66) e CC (10).

Foram ainda utilizados 14 casos negativos para NIC, sendo 10 amostras de pacientes apresentando cervicite, obtidas por biopsia dirigida em exame colposcópico, e 4 casos de miomas uterinos para controle.

4.3 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).

4.4 Imunohistoquímica para MMP-2 e MMP-9

A imuno-histoquímica foi realizada utilizando lâminas silanizadas contendo cortes de 4µm de espessura de porções representativas do tumor parafinado. Inicialmente, as amostras

foram desparafinadas em bateria de xilol, sendo o primeiro incubado por 1 h em estufa a 60 °C e o segundo, por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram imersas na sequência de álcool etílico 100%, 100%, 100% e 70%, por 5 min cada. Após lavagem em água corrente por 5 min e em tampão fosfato-salino (PBS) por 5 min, foi realizada a recuperação antigênica imergindo as lâminas em recipiente com solução de tampão citrato pH 6,0, colocado em panela elétrica sob pressão durante 2 min. As lâminas sofreram resfriamento a temperatura ambiente e foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% e metanol (1:1) por 30 min, lavadas em água corrente por 5 min e PBS 2x5 min. Foi realizado bloqueio com albumina sérica bovina (BSA) diluída em PBS a 1% por 1 h à temperatura ambiente. Após lavagem em PBS 2x5 min, foi realizada a incubação com os anticorpos primários monoclonais anti-MMP2 (sc-53630; diluição 1:400) e anti-MMP9 (sc-21733; 1:200) adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), por 2 h em câmara úmida a 37 °C. Posteriormente, foram realizadas incubações com anticorpo secundário (ADVANCE™ HRP Link; Dako®, Glostrup, Denmark) e terciário (ADVANCE™ HRP Enzyme; Dako®, Glostrup, Denmark) por 20 min cada, em câmara úmida à temperatura ambiente, intercalando com lavagem em PBS 2x5 min. Foram utilizados 20 µL do cromógeno de diaminobenzidina diluídos em 1 mL do substrato tampão (Dako®, Glostrup, Denmark), em média por 3 min. Após lavagem em água destilada por 1 min e água corrente por 5 min, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer por 5 s, lavadas em água corrente por 5 min, e imersas na bateria de álcool etílico 70%, 100%, 100% e 100% por 3 min cada, xilol 2x5 min, seguido da montagem das lâminas com Entelan.

As lâminas foram analisadas e digitalizadas pelo sistema de captura de imagem óptica MICRODIP/Kacil®. Os seguintes escores foram considerados para expressão imuno-histoquímica: Positivo (reatividade em mais de 10% das células epiteliais) e Negativo (menos de 10% de células epiteliais com reatividade). 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, sendo classificados em positivos: fraco (+), moderado (++) e forte (+++). Foi considerado também o tipo celular (epitelial escamoso e glandular), bem como a posição das reações (núcleo ou citoplasma).

4.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do software SPSS for Windows versão 13.0. Foi aplicado o teste Qui-quadrado (χ^2) de *Pearson* para associação entre os grupos de variáveis qualitativas ordinais: intensidades da expressão imuno-histoquímica e graus histopatológicos de lesões cervicais. A significância estatística foi definida em $p < 0,05$.

5 EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 E 9 NAS LESÕES PRÉ-MALIGNAS E MALIGNAS DA CÉRVIX UTERINA

INTRODUÇÃO

O câncer do colo uterino é o quarto tipo de câncer mundialmente mais comum entre as mulheres e o sétimo na população em geral¹. No Brasil, esta neoplasia é a terceira mais frequente no gênero feminino, com mais de 15 mil casos novos a cada ano².

A infecção persistente pelo papilomavírus humano dos tipos de alto risco oncogênico está associada ao câncer cervical³, porém uma pequena percentagem de mulheres infectadas por estes vírus desenvolve lesões pré-malignas que podem evoluir à invasão. Portanto, outros cofatores são necessários para a persistência viral que, após 2 anos sem intervenção, leva à expressão desregulada e concomitante das oncoproteínas transformantes E6 e E7⁴⁻⁵.

A família de metaloproteinases da matriz (MMPs, do inglês, *Matrix Metalloproteinases*) tem sido explorada como importante ferramenta na detecção precoce, prognóstico e metástase em diversos cânceres humanos. Essas proteases são capazes de degradar os componentes da matriz extracelular (MEC) e membrana basal (MB), além de possuírem função na modulação da adesão celular, na regulação de fatores de crescimento e seus receptores, de citocinas e quimiocinas, na angiogênese e na transição epitélio-mesenquimal (TEM), uma característica marcadora de metástase na progressão tumoral⁶.

Numerosos estudos apóiam a possibilidade de que a superexpressão de MMPs promova crescimento tumoral e metástase no carcinoma do colo uterino⁷. Uma apreciação de como essas enzimas estão ligadas ao desenvolvimento e progressão do câncer pode melhorar as estratégias diagnósticas e terapêuticas, bem como fornecer informações quanto ao prognóstico das lesões cervicais.

Neste intuito, o presente estudo teve como objetivo investigar, através de técnica imuno-histoquímica, a associação dos níveis de expressão das metaloproteinases da matriz 2 e 9 em diferentes graus de lesões cervicais.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado através do método observacional, analítico transversal.

Foram avaliadas as fichas dos diagnósticos histopatológicos de biopsias do colo uterino obtidas por procedimento cirúrgico de conização, entre 2011 e 2015, arquivados no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas de Recife, Pernambuco, Brasil. Foram selecionados os casos com diagnóstico positivo para NIC e/ou carcinoma escamoso invasor. Foram excluídos os casos para os quais não foi possível localizar o(s) bloco(s) ou lâmina(s) referente(s) para confirmação do diagnóstico.

O total de 114 casos de cones de lesões cervicais uterinas emblocadas em parafina foi utilizado. Os casos foram divididos, de acordo com o diagnóstico histopatológico, nos seguintes grupos: NIC I (8), NIC II (30), NIC III (66) e CC (10).

Foram ainda utilizados 14 casos negativos para NIC, sendo 10 amostras de pacientes apresentando cervicite, obtidas por biopsia dirigida em exame colposcópico, e 4 casos de miomas uterinos para controle.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco, através do protocolo CAAE nº 17068913.6.0000.5208, obedecendo integralmente aos princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica (IHQ) foi realizada utilizando lâminas silanizadas contendo cortes de 4µm de espessura de porções representativas do tumor parafinado. Inicialmente, as amostras foram desparafinadas em bateria de xilol, sendo o primeiro incubado por 1 h em estufa a 60 °C e o segundo, por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram imersas na sequência de álcool etílico 100%, 100%, 100% e 70%, por 5 min cada. Após lavagem em água corrente por 5 min e em tampão fosfato-salino (PBS) por 5 min, foi realizada a recuperação antigênica imergindo as lâminas em recipiente com solução de tampão citrato pH 6,0, colocado em panela elétrica sob pressão durante 2 min. As lâminas sofreram resfriamento a temperatura ambiente e foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% e metanol (1:1) por 30 min, lavadas em água corrente por 5 min e PBS 2x5 min. Foi realizado bloqueio com albumina sérica bovina (BSA) diluída em PBS a 1% por 1 h à temperatura ambiente. Após lavagem em PBS 2x5 min, foi realizada a incubação com os

anticorpos primários monoclonais anti-MMP2 (sc-53630; diluição 1:400) e anti-MMP9 (sc-21733; 1:200) adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), por 2 h em câmara úmida a 37 °C. Posteriormente, foram realizadas incubações com anticorpo secundário (ADVANCE™ HRP Link; Dako®, Glostrup, Denmark) e terciário (ADVANCE™ HRP Enzyme; Dako®, Glostrup, Denmark) por 20 min cada, em câmara úmida à temperatura ambiente, intercalando com lavagem em PBS 2x5 min. Foram utilizados 20 µL do cromógeno de diaminobenzidina diluídos em 1 mL do substrato tampão (Dako®, Glostrup, Denmark), em média por 3 min. Após lavagem em água destilada por 1 min e água corrente por 5 min, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer por 5 s, lavadas em água corrente por 5 min, e imersas na bateria de álcool etílico 70%, 100%, 100% e 100% por 3 min cada, xilol 2x5 min, seguido da montagem das lâminas com Entelan.

As lâminas foram analisadas e digitalizadas pelo sistema de captura de imagem óptica MICRODIP/Kacil®. Os seguintes escores foram considerados para expressão imuno-histoquímica: Positivo (reatividade em mais de 10% das células epiteliais) e Negativo (menos de 10% de células epiteliais com reatividade). 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, sendo classificados em positivos: fraco (+), moderado (++) e forte (+++). Foi considerado também o tipo celular (epitelial escamoso e glandular), bem como a posição das reações (núcleo ou citoplasma).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do software SPSS for Windows versão 13.0. Foi aplicado o teste Qui-quadrado (χ^2) de *Pearson* para associação entre os grupos de variáveis qualitativas ordinais: intensidades da expressão imuno-histoquímica e graus histopatológicos de lesões cervicais. A significância estatística foi definida em $p < 0,05$.

RESULTADOS

Do total de 128 amostras teciduais utilizadas para a técnica IHQ, o número total de casos para cada grupo em que o tecido epitelial foi preservado, permitindo a avaliação, está representado nas Tabelas 1 a 4 (em anexo).

MMP-2

No citoplasma das células epiteliais escamosas, observou-se expressão de MMP-2 em 35 de 102 casos de lesões cervicais avaliados. Expressão de intensidade fraca foi vista no CC (n=5; 50%), e na maioria dos casos positivos em NIC III (n=19; 33,3%), II (n=5; 17,9%) e cervicite (n=3; 30%). Expressão moderada à forte foi observada em menor escala em NIC III (n=4; 7%) e em um caso de NIC II (3,5%). NIC I foi negativa para MMP-2 no citoplasma.

No núcleo, MMP-2 foi expressa em metade dos casos de invasão, com intensidade fraca (n=2; 20%) e moderada (n=3; 30%). Dentre as lesões pré-malignas, apenas NIC II (n=2; 7,2%) e NIC III (n=6; 10,5%) foram positivas. O percentual de casos com intensidade moderada aumentou de NIC II (n=1; 3,6%) para NIC III (n=4; 7%), sendo ainda maior na invasão (n=3; 30%). Todos os casos de mioma (controle; n=3) e 70% (n=7) das cervicites expressaram MMP-2 no núcleo.

Na presença de lesões escamosas intra-epiteliais, o citoplasma de células glandulares adjacentes mostrou expressão de MMP-2 em apenas 2 casos de NIC III (3,8%), um caso de NIC II (4,5%) e em 2 (50%) controles. CC, NIC I e cervicite foram negativos para todos os casos.

No núcleo de células glandulares, positividade foi observada em um caso de NIC-I (16,7%), NIC-III (n=10; 19,2%), sendo menor na invasão (n=1; 10%). Já nos grupos de controle e cervicite, a expressão de MMP-2 foi elevada, com 75% (n=3) e 50% (n=4) de casos positivos, respectivamente.

As Figuras 1 e 2 mostram a expressão da MMP-2 por IHQ nos casos analisados. Os resultados da associação estatística sugeriram p-valores significativos para a expressão de MMP-2 no núcleo de células escamosas (Tabela 1) e no citoplasma e núcleo de células glandulares adjacentes (Tabela 2).

MMP-9

No citoplasma das células escamosas, a maioria dos casos de CC foi positiva para a MMP-9, com intensidades fraca (n=5; 50%) e moderada (n=1; 10%). O percentual de casos positivos foi menor em NIC III (n=16; 26,6%), NIC II (n=2; 6,9%) e NIC I (n=1; 14,3%). Nas cervicites, 2 (20%) casos foram positivos no citoplasma, e apenas um caso controle foi avaliado, mostrando expressão fraca da MMP-9.

No núcleo, também foi observada positividade nos grupos de CC (n=6; 60%) e cervicite (n=3; 30%). Um caso de NIC III (1,7%) e um de NIC II (3,4%) mostrou expressão fraca. NIC I e o caso controle foram negativos.

Para o citoplasma de células glandulares adjacentes, apenas 2 (3,6%) casos de NIC III foram positivos. Todos os demais grupos de lesões, bem como o de cervicite, mostraram ausência de expressão. No controle, 2 (66,7%) dos 3 casos avaliados foram positivos para MMP-9 no citoplasma de células glandulares.

No núcleo, ausência de expressão foi observada no controle e nas lesões pré-malignas. Em um caso de CC (10%) e um de cervicite (12,5%) observou-se positividade nuclear para MMP-9.

As Figuras 3 e 4 mostram a expressão da MMP-9 nos casos analisados. Associação estatística significativa foi sugerida para a expressão de MMP-9 no núcleo das células escamosas (Tabela 3) e no citoplasma das células glandulares (Tabela 4).

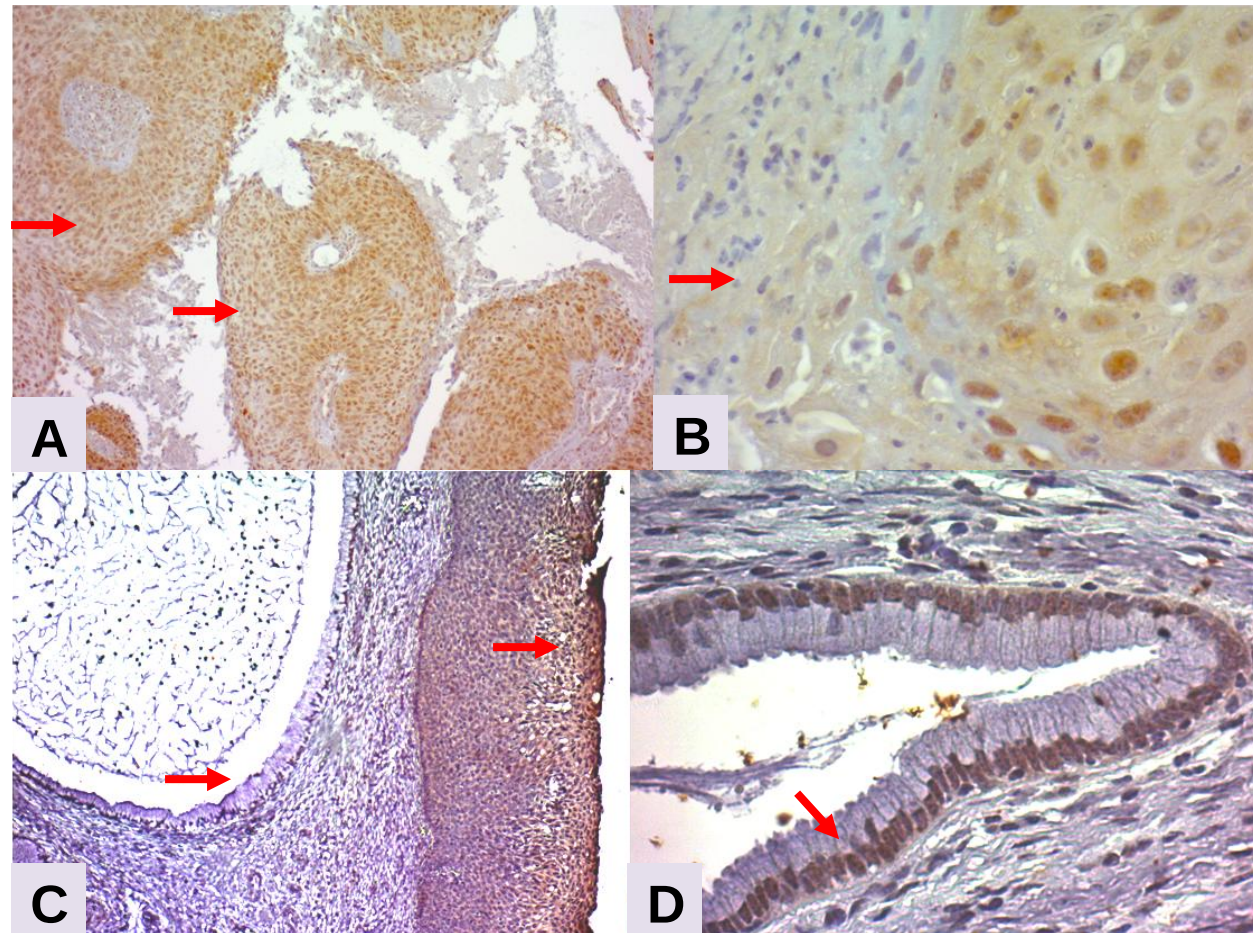


Figura 1. Expressão da MMP-2 por imuno-histoquímica em tecidos cervicais. **A** – Expressão fraca no citoplasma e moderada no núcleo das células escamosas de CC (aumento de 100X); **B** – Em maior aumento, expressão fraca também é observada nas células do estroma adjacente no CC (400X); **C** – Expressão moderada no citoplasma de células escamosas e ausência de expressão nas células glandulares adjacentes em NIC III (100X); **D** – Expressão moderada no núcleo de células glandulares adjacentes à lesão de NIC III (400X).

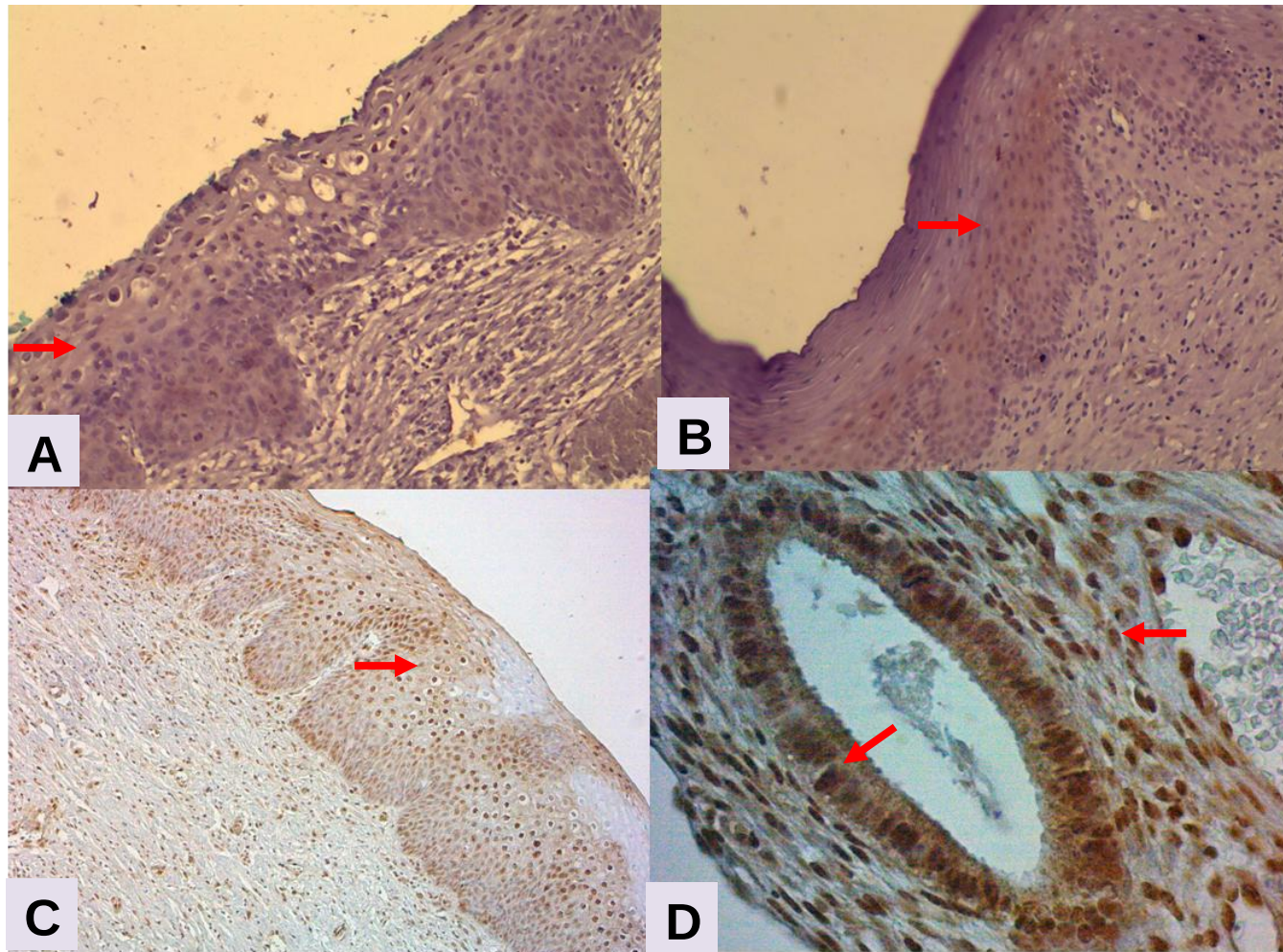


Figura 2. Expressão da MMP-2 por imuno-histoquímica em tecidos cervicais. **A** – Ausência de expressão nas células escamosas de NIC I (aumento de 200X); **B** – Expressão fraca no citoplasma de células da camada parabasal em NIC II (200X); **C** – Expressão forte no núcleo e fraca no citoplasma de células escamosas em caso controle (100X); **D** – Expressão forte no núcleo das células glandulares e estromais em caso controle (400X).

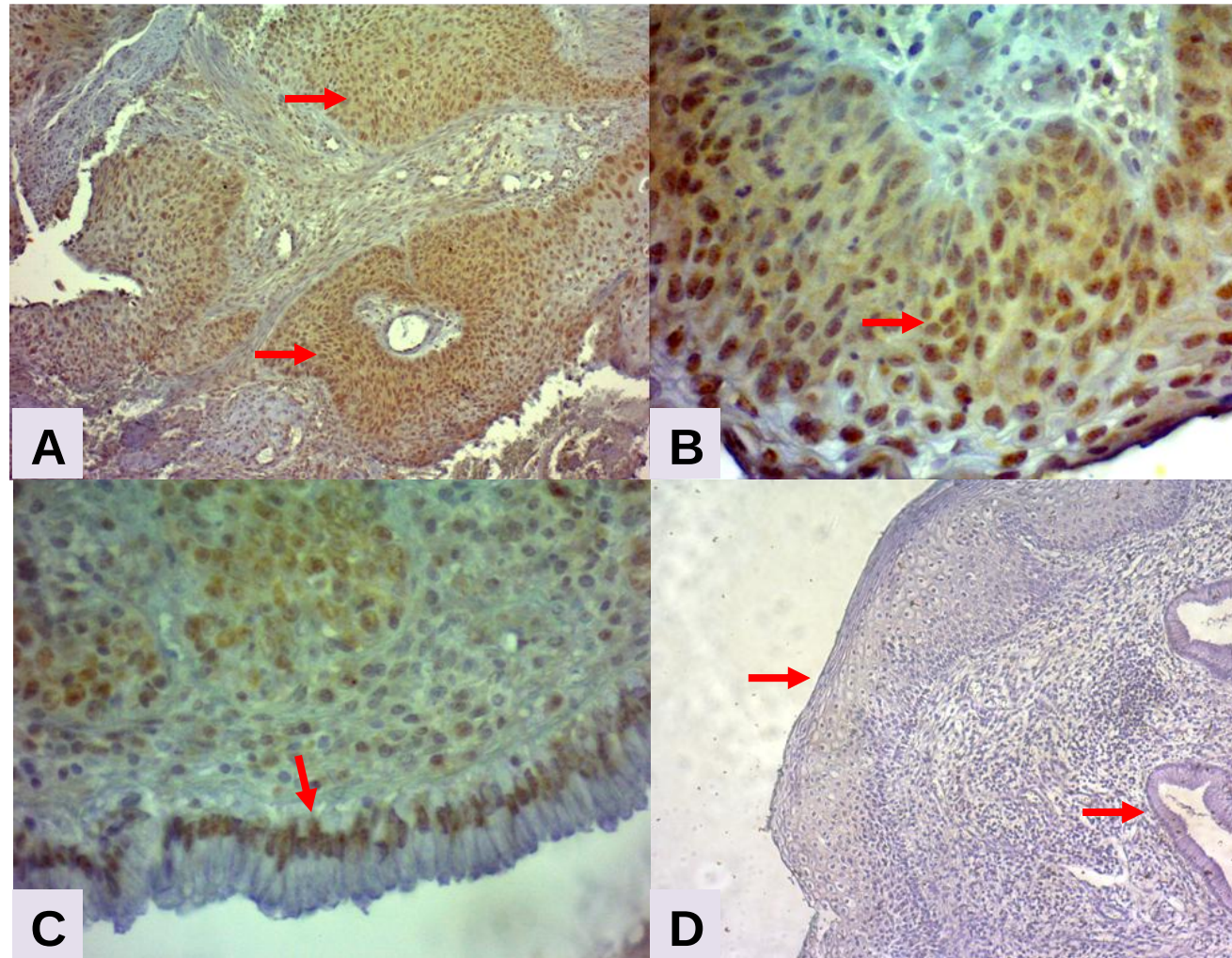


Figura 3. Expressão da MMP-9 por imuno-histoquímica em tecidos cervicais. **A** – Expressão fraca no citoplasma e moderada no núcleo das células escamosas de CC, e fraca em células do estroma (100X); **B** – Expressão na invasão, em maior aumento (aumento de 400X); **C** – Expressão nuclear fraca em células glandulares adjacentes à presença de CC (400X); **D** – Ausência de expressão nas células escamosas e glandulares adjacentes em NIC II (100X).

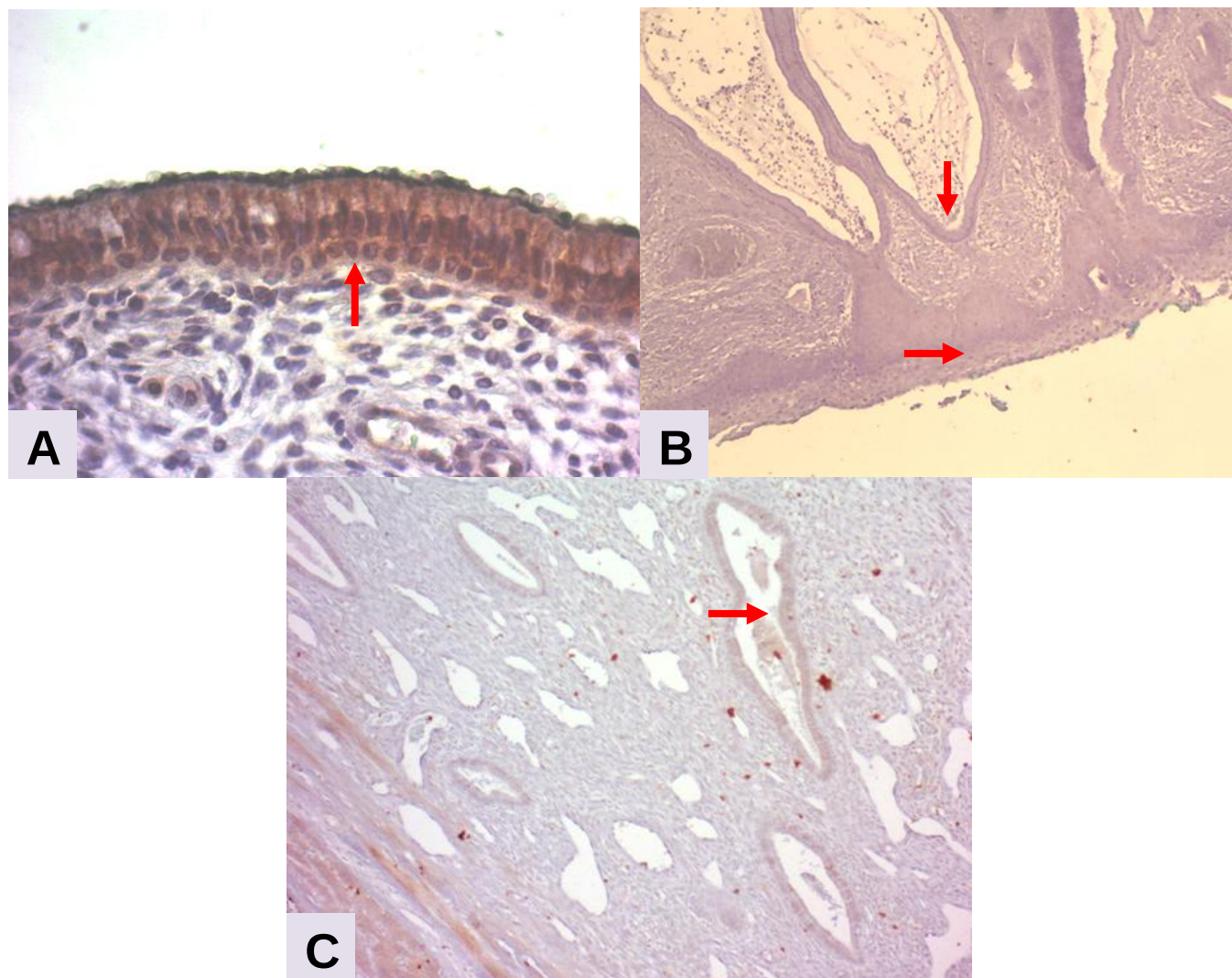


Figura 4. Expressão da MMP-9 por imuno-histoquímica em tecidos cervicais. **A** – Expressão moderada no citoplasma e fraca no núcleo glandular em NIC III (aumento de 400X); **B** – Ausência de expressão nas células escamosas e glandulares adjacentes em NIC I (100X); **C** – Expressão fraca no citoplasma glandular em caso controle (100X).

DISCUSSÃO

Apenas uma pequena percentagem das infecções pelos HPVs de alto risco progride a lesões que podem chegar à invasão⁹⁻¹⁰. Uma melhor compreensão acerca dos mecanismos moleculares que podem tornar as células de lesões intra-epiteliais cervicais capazes de invadir o estroma adjacente e metastatizar teria grande importância clínica¹¹.

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 tumoral¹².

No presente estudo, foi observada uma tendência de diminuição da expressão IHQ de MMP-2 no citoplasma e núcleo das células escamosas na ausência de lesão intra-epitelial (casos controle e cervicite) à NIC I, que foi negativa para todos os casos. Adicionalmente, houve um aumento de expressão com intensidade “fraca” no citoplasma e de “fraca” à “moderada” no núcleo a partir da NIC II até a invasão. No núcleo, este aumento foi mais expressivo entre NIC III e CC.

Os resultados deste trabalho corroboram a literatura que relatou maior expressão imuno-histoquímica de MMP-2 nas células neoplásicas de câncer¹³⁻¹⁷, e positividade também nas lesões pré-invasivas de alto grau^{13,15-17}, com menor intensidade nas lesões de baixo grau. Branca *et al.*¹⁷ descreveu ainda um aumento linear de expressão da MMP-2 com a progressão do grau de NIC. Resultado semelhante foi visto apenas na expressão nuclear neste trabalho, de NIC II ao CC.

Minami *et al.*¹⁴, por sua vez, relatou ausência de MMP-2 em todas lesões cervicais precursoras, o que foi observado apenas em NIC I no presente estudo.

Em tecido glandular, MMP-2 foi negativa para quase todos os casos na presença de lesão. O maior percentual de positividade glandular foi no citoplasma de casos controle, com intensidade fraca. Apesar disso, um número reduzido de controles foram avaliados. Apenas um caso de NIC I e quatro de NIC 3 apresentaram expressão “forte” e “moderada”, respectivamente, no núcleo glandular.

No presente estudo, a expressão de MMP-9 também tendeu a ser crescente no citoplasma escamoso, da NIC I ao câncer, com intensidade fraca. A positividade nuclear foi mais expressiva apenas na invasão e em cervicite.

Células glandulares foram quase sempre negativas para MMP-9. Apesar de uma associação estatística sugerida, o número total de controles positivos foi bastante limitado para respaldar este achado (n=2; 66,7%).

Na literatura, MMP-9 foi observada tanto em células escamosas como do estroma nas lesões de alto grau^{13,15,18} e no CC^{13,15}. Este trabalho concordou com esses dados, observando-se maior expressão de MMP-9 no citoplasma das células escamosas de NIC 3 (26,6%) e no citoplasma e núcleo escamoso na invasão (60% em ambos). Alguns casos de CC mostraram expressão fraca em células estromais (Figura 1B).

Este trabalho apresentou limitações quanto à padronização da quantidade de casos, com reduzido número de casos controle e NIC I. Porém, tendências importantes de aumento da expressão das MMPs entre as lesões de alto grau e a invasão foram observadas. Estudos de coorte necessitam ser realizados para avaliar o valor prognóstico das MMPs 2 e 9 nas lesões cervicais pré-malignas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares e ao Departamento de Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, ao Hospital das Clínicas (Recife, Pernambuco, Brasil) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C *et al.* GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2013. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>.
2. INCA – Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>
3. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2(5):342–50.
4. Steben M, Duarte-Franco E. Human Papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol* 2007;107(2 Suppl 1):S2–5.
5. Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 2002 Nov;89(2):213–28.
6. Roy R, Yang J, Moses MA. *J Clin Oncol.* Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. 2009;27(31):5287-97.

7. Libra M, Scalisi A, Vella N, Clementi S, Sorio R, Stivala F *et al.* Uterine cervical carcinoma: role of matrix metalloproteinases (review). *Int J Oncol.* 2009;34(4):897-903.
8. Brummer O, Böhmer G, Hollwitz B, Flemming P, Petry K-U, Kühnle H. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation--an immunohistochemical study. *Gynecol Oncol.* 2002;84(2):222-7.
9. Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH. Assessing the annual economic burden of preventing and treating anogenital human papillomavirus-related disease in the US: analytic framework and review of the literature. *Pharmacoeconomics.* 2005;23(11):1107-22.
10. McCredie MRE, Sharples KJ, Paul C, Baranyai J, Medley G, Jones RW, *et al.* Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol.* 2008 May;9(5):425-34.
11. Martin CM, O'Leary JJ. Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011 Oct;25(5):605-15.
12. Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Ahmad R, Kaur G. Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(3):1085-91.
13. Asha Nair S, Karunakaran D, Nair MB, Sudhakaran PR. Changes in matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during tumor progression in the uterine cervix. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003;129(2):123-31.
14. Minami R, Tsunoda H, Iijima T, Yoshikawa H, Nemori R, Noguchi M. Early acquisition of gelatinolytic activity in carcinogenesis of the uterine cervix. *Mod Pathol.* 2003;16(11):1164-70.
15. Sheu BC, Lien HC, Ho HN, Lin HH, Chow SN, Huang SC *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.
16. Malina R, Motoyama S, Hamana S, Maruo T. Laminin-5 gamma2 chain and matrix metalloproteinase-2 expression in the neoplastic changes of uterine cervical squamous epithelium. *Kobe J Med Sci.* 2004;50(3-4):123-30.
17. Branca M, Ciotti M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Costa S *et al.* Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its tissue inhibitor (TIMP-2) are prognostic factors in cervical cancer, related to invasive disease but not to high-risk human papillomavirus (HPV) or virus persistence after treatment of CIN. *Anticancer Res.* 2006;26(2B):1543-56.
18. Schröer N, Pahne J, Walch B, Wickenhauser C, Smola S. Molecular pathobiology of human cervical high-grade lesions: paracrine STAT3 activation in tumorinstructed myeloid cells drives local MMP-9 expression. *Cancer Res.* 2011;71(1):87-97.

Tabela 1. Expressão imuno-histoquímica da MMP-2 no citoplasma e núcleo das células epiteliais escamosas da cérvix uterina.

<i>Células epiteliais escamosas</i>	<i>Citoplasma</i>					<i>p-valor*</i>	<i>Núcleo</i>					<i>p-valor*</i>
	-	+	++	+++	<i>n</i>		-	+	++	+++	<i>N</i>	
<i>CC</i>	5 (50,0%)	5 (50,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	10 (100%)		5 (50,0%)	2 (20,0%)	3 (30,0%)	0 (0,0%)	10 (100%)	
<i>NIC III</i>	33 (57,9%)	19 (33,3%)	4 (7,0%)	1 (1,8%)	57 (100%)		51 (89,5%)	2 (3,5%)	4 (7,0%)	0 (0,0%)	57 (100%)	
<i>NIC II</i>	22 (78,6%)	5 (17,9%)	1 (3,5%)	0 (0,0%)	28 (100%)		26 (92,8%)	1 (3,6%)	1 (3,6%)	0 (0,0%)	28 (100%)	
<i>NIC I</i>	7 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	7 (100%)	0,744	7 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	7 (100%)	0,000**
<i>Cervicite</i>	6 (60,0%)	3 (30,0%)	1 (10,0%)	0 (0,0%)	10 (100%)		3 (30,0%)	3 (30,0%)	3 (30,0%)	1 (10,0%)	10 (100%)	
<i>Controle</i>	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (100%)		0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)	3 (100%)	
Total					115		Total					115

Legenda: CC (câncer cervical); NIC I/II/III (Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau I/II/III); - (ausência de expressão); + (expressão de intensidade fraca); ++ (expressão de intensidade moderada); +++ (expressão de intensidade forte). *Teste Qui-Quadrado; **associação estatística significativa.

Tabela 2. Expressão imuno-histoquímica da MMP-2 no citoplasma e núcleo das células epiteliais glandulares da cérvix uterina.

<i>Células epiteliais glandulares</i>	<i>Citoplasma</i>					<i>p-valor*</i>	<i>Núcleo</i>					<i>p-valor*</i>
	-	+	++	+++	<i>n</i>		-	+	++	+++	<i>N</i>	
<i>CC</i>	10 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	10 (100%)		9 (90,0%)	1 (10,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	10 (100%)	
<i>NIC III</i>	50 (96,2%)	2 (3,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	52 (100%)		42 (80,8%)	6 (11,5%)	4 (7,7%)	0 (0,0%)	52 (100%)	
<i>NIC II</i>	21 (95,5%)	1 (4,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	22 (100%)		22 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	22 (100%)	
<i>NIC I</i>	6 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	6 (100%)	0,002**	5 (83,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (16,7%)	6 (100%)	0,000**
<i>Cervicite</i>	8 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	8 (100%)		4 (50,0%)	4 (50,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	8 (100%)	
<i>Controle</i>	2 (50,0%)	2 (50,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (100%)		1 (25,0%)	1 (25,0%)	2 (50,0%)	0 (0,0%)	4 (100%)	
Total					102		Total					102

Legenda: CC (câncer cervical); NIC I/II/III (Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau I/II/III); - (ausência de expressão); + (expressão de intensidade fraca); ++ (expressão de intensidade moderada); +++ (expressão de intensidade forte). *Teste Qui-Quadrado; **associação estatística significativa.

Tabela 3. Expressão imuno-histoquímica da MMP-9 no citoplasma e núcleo das células epiteliais escamosas da cérvix uterina.

Células epiteliais escamosas	Citoplasma					p-valor*	Núcleo					p-valor*
	-	+	++	+++	n		-	+	++	+++	n	
CC	4 (40,0%)	5 (50,0%)	1 (10,0%)	0 (0,0%)	10 (100%)	0,072	4 (40,0%)	3 (30,0%)	3 (30,0%)	0 (0,0%)	10 (100%)	0,000**
NIC III	44 (73,3%)	14 (23,3%)	2 (3,3%)	0 (0,0%)	60 (100%)		59 (98,3%)	1 (1,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	60 (100%)	
NIC II	27 (93,1%)	2 (6,9%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	29 (100%)		28 (96,6%)	1 (3,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	29 (100%)	
NIC I	6 (85,7%)	1 (14,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	7 (100%)		7 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	7 (100%)	
Cervicite	8 (80,0%)	2 (20,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	10 (100%)		7 (70,0%)	2 (20,0%)	1 (10,0%)	0 (0,0%)	10 (100%)	
Controle	0 (0,0%)	1 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (100%)		1 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (100%)	
Total					117		Total					117

Legenda: CC (câncer cervical); NIC I/II/III (Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau I/II/III); - (ausência de expressão); + (expressão de intensidade fraca); ++ (expressão de intensidade moderada); +++ (expressão de intensidade forte). *Teste Qui-Quadrado; **associação estatística significativa.

Tabela 4. Expressão imuno-histoquímica da MMP-9 no citoplasma e núcleo das células epiteliais glandulares da cérvix uterina.

Células epiteliais glandulares	Citoplasma					p-valor*	Núcleo					p-valor*
	-	+	++	+++	n		-	+	++	+++	N	
CC	10 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	10 (100%)	0,000**	9 (90,0%)	1 (10,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	10 (100%)	0,377
NIC III	53 (96,4%)	1 (1,8%)	1 (1,8%)	0 (0,0%)	55 (100%)		54 (98,2%)	0 (0,0%)	1 (1,8%)	0 (0,0%)	55 (100%)	
NIC II	22 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	22 (100%)		22 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	22 (100%)	
NIC I	6 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	6 (100%)		6 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	6 (100%)	
Cervicite	8 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	8 (100%)		7 (87,5%)	1 (12,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	8 (100%)	
Controle	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (100%)		3 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (100%)	
Total					104		Total					104

Legenda: CC (câncer cervical); NIC I/II/III (Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau I/II/III); - (ausência de expressão); + (expressão de intensidade fraca); ++ (expressão de intensidade moderada); +++ (expressão de intensidade forte). *Teste Qui-Quadrado; **associação estatística significativa.

6 Conclusões

- Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram uma tendência de aumento na expressão das MMPs 2 e 9 nos casos de invasão em relação a condições pré-malignas, tanto no citoplasma quanto no núcleo de células epiteliais escamosas. Também foi identificada uma diminuição da expressão das MMPs 2 e 9 no citoplasma das células glandulares adjacentes na presença do carcinoma escamoso invasor, quando comparadas ao controle;
- Foi observada uma associação estatística significativa para a intensidade da expressão nuclear de ambas as MMPs nas células epiteliais escamosas;
- Este trabalho apresentou limitações quanto à padronização da quantidade de casos com reduzido número de casos controle e NIC I. Estudos de coorte podem ser realizados para avaliar o valor prognóstico das MMPs 2 e 9 nos estágios pré-invasivos.

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**, Berlin, v. 200, n. 2, p. 127-35, May 2011.

BELAAOUAJ, A. *et al.* Human Macrophage Metalloelastase Genomic organization, chromosomal localization, gene linkage, and tissue-specific expression. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 270, n. 24, p. 14568–75, June 1995.

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

BERNARD, H.-U. *et al.* Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70–9, Mar. 2010.

BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 786–801, 2014.

BRAY, F. *et al.* Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. **International Journal of Cancer**, v. 132, n. 5, p. 1133–45, 2013.

BROOKS, P. C. *et al.* Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. **Cell**, v. 85, n. 5, p. 683–93, 1996.

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.

BUTLER, G. S. *et al.* The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase “receptor” regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 2, p. 871–80, 1998.

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**, San Francisco, v. 7, n. 3, p. e33585, Mar. 2012. Disponível em:

<<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0033585&representation=PDF>>. Acesso em: 13 maio 2013.

CATTANI, P. *et al.* Clinical performance of human papillomavirus E6 and E7 mRNA testing for high-grade lesions of the cervix. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 47, n. 12, p. 3895-3901, Dec. 2009.

DE SANJOSÉ, S. *et al.* Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 7, n. 7, p. 453–9, 2007.

DE VILLIERS, E. M. *et al.* Classification of papillomaviruses. **Virology**, New York, v. 324, n. 1, p. 17-27, June 2004.

DEHN, D.; TORKKO, K. C.; SHROYER, K. R. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. **Cancer**, Hoboken, v. 111, n. 1, p. 1-14, Feb. 2007.

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**, Oxford, v. 91, n. 4, p. 368-73, Aug. 2010.

DOORBAR, J. The Papillomavirus life cycle. **J Clin Virol**, Amsterdam, v. 32, p. S7-15, Mar. 2005. Supplement 1.

DUNNE, E. F. *et al.* Prevalence of HPV infection among females in the United States. **JAMA**, v. 297, n. 8, p. 813–9, 2007.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews. Cancer*, v. 2, n. 3, p. 161–174, 2002.

FERLAY, J. *et al.* GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Disponível em <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 14 out. 2014.

FRAZER, I. Correlating immunity with protection for HPV infection. **Int J Infect Dis**, Hamilton, v.11, p. S10-6, Nov. 2007. Supplement 2.

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**, Baltimore, v. 33, n. 1, p. 189-95, Jan. 2001.

GAIOTTO, M. A. *et al.* Comparative study of MMP-2 (matrix metalloproteinase 2) immune expression in normal uterine cervix, intraepithelial neoplasias, and squamous cells cervical carcinoma. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v. 190, n. 5, p. 1278-82, May 2004.

GIARRE, M. *et al.* Induction of pRb degradation by the Human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a - imposed G1 cell cycle arrest. **J. Virol.** v. 75, p. 4705-12, 2001.

GROSS, J.; LAPIERE, C. M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 48, n. 6, p. 1014-22, 1962.

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

HWANG, S. J.; SHROYER, K. R. Biomarkers of cervical dysplasia and carcinoma. **J Oncol**, Cairo, v. 2012, p. 507286, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3205687/pdf/JO2012-507286.pdf>>. Acesso em: 4 jun. 2013.

INCA - Instituto Nacional de Câncer (Brasil). **Estimativa 2014**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012>>. Acesso em: 14 out. 2014.

INSINGA, R. P.; DASBACH, E. J.; ELBASHA, E. H. Assessing the annual economic burden of preventing and treating anogenital human papillomavirus-related disease in the US: analytic framework and review of the literature. **Pharmacoeconomics**, v. 23, n. 11, p. 1107-22, 2005.

ITOH, Y. *et al.* Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. **The EMBO journal**, v. 20, n. 17, p. 4782-93, 2001.

KHOKHA, R.; MURTHY, A.; WEISS, A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nature Reviews*. **Immunology**, v. 13, n. 9, p. 649-65, 2013.

LIBRA, M. *et al.* Uterine cervical carcinoma: role of matrix metalloproteinases (review). **Int J Oncol**, Athens, v. 34, n. 4, p. 897-903, Apr. 2009.

LYNGE, E. *et al.* What's next? Perspectives and future needs of cervical screening in Europe in the era of molecular testing and vaccination. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 45, n. 15, p. 2714–21, 2009.

MARKOWITZ, L. E. *et al.* Human papillomavirus vaccine introduction--the first five years. **Vaccine**, v. 30 Suppl 5, p. F139–48, 2012.

MASSAD, L. Stewart *et al.* 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. **Obstetrics and Gynecology**, v. 121, n. 4, p. 829–46, 2013.

MCCREDIE, M. R. E. *et al.* Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. **The Lancet. Oncology**, v. 9, n. 5, p. 425–34, 2008.

MILES, F. L.; SIKES, R. A. Insidious changes in stromal matrix fuel cancer progression. **Molecular cancer research**, v. 12, n. 3, p. 297–312, 2014.

MIN, W. *et al.* Microarray analysis identifies differentially expressed genes induced by human papillomavirus type 18 E6 silencing RNA. **Int J Gynecol Cancer**, Philadelphia, v. 19, n. 4, p. 547-63, May 2009.

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, Aug. 2010.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews*. **Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550–60, 2010.

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

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, Feb. 2003.

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

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, v. 69, n. 3, p. 562–73, 2006.

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

OLSON, M. W. *et al.* High affinity binding of latent matrix metalloproteinase-9 to the alpha2(IV) chain of collagen IV. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 17, p. 10672–81, 1998.

OSTÖR, A. G. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. **International Journal of Gynecological Pathology**: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists, v. 12, n. 2, p. 186–92, 1993.

PETRY, K. U. Management options for cervical intraepithelial neoplasia. Best Practice & Research. **Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 25, n. 5, p. 641-51, 2011.

PITTAYAKHAJONWUT, D.; ANGELETTI, P. C. Viral trans-factor independent replication of human papillomavirus genomes. **Virology**, London, v. 7, p. 123, June 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2893153/pdf/1743-422X-7-123.pdf>>. Acesso em: 4 jun. 2013.

POLETTE, M. C.; GILLES, B.; NAWROCKI *et al.* TCSF expression and localization in human lung and breast cancer. **J. Histochem. Cytochem.** 45: 703–9, 1997.

RAJČÁNI, J. *et al.* Detection of regulatory protein p16/INK4A in the dysplastic cervical squamous cell epithelium is a diagnostic tool for carcinoma prevention. [Article in Slovak]. **Cesk Patol**, Praha, v. 45, n. 4, p. 101-7, Oct. 2009. English Abstract.

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.

SATO, H.; TAKINO, T. Coordinate action of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and MMP-2 enhances pericellular proteolysis and invasion. **Cancer Science**, v. 101, n. 4, p. 843–7, 2010.

SCHFFNER, M.; HUIBREGTSE, J. M.; VIERSTRA, R. D.; HOWLEY, P. M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as an ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. **Cell**. Cambridge. v. 75, n. 3, p. 495-505, 1993.

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

SCHULZ, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, p. 211–42, 2007.

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**, Baltimore, v. 63, n. 19, p. 6537-42, Oct. 2003.

SOLOMON, D. *et al.* The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA**, Chicago, v. 287, n. 16, p. 2114-9, Apr. 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. Supplement 1.

STERNLICHT, M. D.; BISSELL, M. J.; WERB, Z. The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. **Oncogene**, Basingstoke, v. 19, n. 8, p. 1102-13, Feb. 2000.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 17, p. 463–516, 2001.

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.

TOTA, J. E. *et al.* The road ahead for cervical cancer prevention and control. **Current Oncology**, Toronto, v. 21, n. 2, p. e255–64, 2014.

WANG, P. *et al.* Clinical significance of matrix metalloproteinase-2 in cancer of uterine cervix: a semiquantitative study of immunoreactivities using tissue array. **Gynecologic Oncology**, v. 108, n. 3, p. 533–42, 2008.

WOESSNER, J. F.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and TIMPs. New Edition. [s.l.]: **Oxford University Press**, 2000.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews*. **Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11–22, 2007.

YADAV, L. *et al.* Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, v. 15, n. 3, p. 1085–91, 2014.

ZHAI, Y. *et al.* Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase is associated with cervical carcinoma progression and invasion. **Cancer Res**, Baltimore, v. 65, n. 15, p. 6543–50, Aug. 2005.

ZUCKER, S. *et al.* Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 878, p. 212–27, 1999.

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

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer**, London, v. 2, n. 5, p. 342-350, May 2002.

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

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: 17068913.6.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: FUNDACAO 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

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



Continuação do Parecer: 413.486

lesões cervicais; Conhecer os níveis de expressão dos genes E5, E6, E7, proteína p16INK4A e das Metaloproteínas em diferentes graus de lesões cervicais; Associar a expressão de E5, E6, E7 e Metaloproteínas; Associar a expressão de Metaloproteínas, E5, E6 e E7 aos diagnósticos citológico, histológico e colposcópico; Constatar a taxa de 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 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