



DAFNE CAROLINA ALVES QUIXABEIRA

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA
METALOPROTEINASE DE MATRIZ 2 ENVOLVIDOS NA
CARCINOGENÊSE CERVICAL**

RECIFE

2016

DAFNE CAROLINA ALVES QUIXABEIRA

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA
METALOPROTEINASE DE MATRIZ 2 ENVOLVIDOS NA
CARCINOGENESE 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

Co-orientadora: Profa. Dra. Bárbara Simas Chagas

RECIFE

2016

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

Q6e	Quixabeira, Dafne Carolina Alves. Estudo dos polimorfismos genéticos da metaloproteinase de matriz 2 envolvidos na carcinogênese cervical / Dafne Carolina Alves Quixabeira. – 2016. 89 f.: il.; tab.; 30 cm. Orientador: Jacinto da Costa Silva Neto. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2016. Inclui referências, apêndices e anexos. 1. Lesão cervical. 2. Metaloproteinase de matriz 2. 3. Polimorfismo. 4. Papillomavirus humano. I. Silva Neto, Jacinto da Costa (Orientador). II. Título. 616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-126)
-----	--

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

AUTORA: Dafne Carolina Alves Quixabeira

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Patologia

NOME DA DISSERTAÇÃO: **“Estudo dos Polimorfismos Genéticos da Metaloproteinase de Matriz 2 Envolvidos na Carcinogênese Cervical”.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

DATA DA DEFESA: 25 de fevereiro de 2016

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Prof. Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Prof. Dra. Carolina Maria Medeiros do Amaral

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE- REITORA

Profa. Florisbela de Arruda Camara e Siquira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Profa. Adriana Maria da Silva Teles

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Profa. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
PATOLOGIA

Prof. Lucas André Cavalcanti Brandão

RECIFE
2016

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir a possibilidade de avançar em mais uma etapa da minha formação e a persistir com disciplina.

Aos meus pais e irmãos (Bruna e Erasmo Quixabeira) pelo apoio e compreensão imprescindíveis durante todo o processo. Não conseguiria nada se não fosse vocês e por vocês.

Aos meus padrinhos pela presença constante e fundamental durante toda a minha formação acadêmica e pessoal.

Ao professor Jacinto Costa pela oportunidade a mim oferecida e confiança no meu trabalho.

À co-orientadora Bárbara Simas por todo o auxílio, orientação e compreensão indispensáveis para o desenvolvimento e conclusão do trabalho.

Ao professor Antonio Freitas por toda a solicitude e orientação espontânea para com o desenvolvimento do trabalho. Além de toda a atenção que dedicou a mim durante esse período.

À Ana Pavla pela sensibilidade em antecipar diversas entraves, que poderiam ocorrer durante o projeto e pelas propostas de solução. Além de toda a atenção gratuita demonstrada comigo durante esse período.

A Sérgio Paiva e a Mariléa Guimarães pela solicitude e prontidão na ajuda.

Aos novos amigos formados: Kamylla Nascimento, Antônio Humberto, Marconi Rêgo e toda a equipe do LEMTE. Agradeço por todo o auxílio, partilha de conhecimento e amizade.

Ao meu violão e ukulele pelos precisos acordes fugazes abrandando os inúmeros momentos de angústia e apreensão.

À todas as pacientes que se dispuseram a participar da presente pesquisa. Essa pesquisa é dedicada à futura melhora da qualidade de vida de vocês.

Às agências de fomento que viabilizaram a realização do presente trabalho: CAPES, CNPQ e FACEPE.

RESUMO

O câncer de colo do útero apresenta distribuição a nível mundial, correspondendo ao quarto mais incidente entre as mulheres. Está associado à infecção prévia pelo Papillomavírus Humano (HPV) em quase a totalidade dos casos. Diversos cofatores atuam em consonância ao HPV para o surgimento de lesões cervicais e posterior carcinoma. Importante destaque como cofator deve ser dado às metaloproteinases de matriz (MMP), enzimas proteolíticas que participam da lise tanto de componentes da matriz extracelular (MEC), como os que não pertencem a matriz. Particularmente a MMP-2 tem destaque relevante no câncer cervical, por favorecer a progressão de lesões *in situ* para a invasão ao lisar a membrana basal. Polimorfismos na região promotora desse gene têm sido associados ao aumento do risco da progressão do câncer e formação de metástases. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a possível associação dos polimorfismos de base única (SNP) -1306C/T e -735C/T, presentes na região promotora do gene da MMP-2 em lesões cervicais em mulheres de dois Estados da região Nordeste do Brasil. Foram avaliados 52 casos de lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL) e 67 lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL) para o polimorfismo -1306 C/T. Enquanto que 63 casos de LSIL e 73 casos de HSIL foram selecionados para a avaliação do SNP -735C/T. 95 casos com citologia normal foram selecionados como grupo controle do -1306C/T e 91 casos para o -735 C/T. A amplificação gênica e posterior genotipagem foram feitas por meio de PCR-RFLP, com o uso das enzimas Pvu II e Hinf I, para os SNP-1306C/T e -735C/T, respectivamente. A MMP-2 C1306T não apresentou associação significativa entre os grupos LSIL e o controle ($p=0,1734$ OR=0.37; 95 % CI=0.3-1.58). Assim como entre os grupos controle e HSIL ($p=0,7118$ OR=0.08; 95 % CI=0.93-3.3). O mesmo foi observado para a avaliação do MMP-2 C735T, pois não foi encontrada associação significativa entre o grupo LSIL e o controle ($p=0,7948$; OR=0,94; 95 % CI=0,56-2,15), bem como entre o grupo HSIL e o controle ($p=0,7398$; OR=1,07; 95 % CI=0,50-1,64). A presença do genótipo TT no modelo recessivo apresentou-se como fator protetor da progressão das lesões cervicais ($p=0,03566$; OR=0,66; 95 % CI=0,10-0,96). Em relação ao uso de contraceptivo oral como cofator, não foram encontradas associações, tanto entre os casos LSIL ($p=0,370$ OR=0.65; 95 % CI=0.35-1.93) e HSIL ($p=0,6527$; OR=0.08; 95 % CI=0.93-3.3) -1306C/T, quanto para os casos LSIL ($p=0,57649$; OR= 0,9; 95% CI=0.60-2.54) e HSIL ($p=0,6269$; OR= 0,74; 95% CI=0.47-1.57) do -735C/T. A associação entre a infecção pelo HPV e os genótipos C735T e C1306T não foi significativa ($p > 0,05$). No presente estudo, apenas a presença do genótipo TT do MMP-2 C735T apresentou relevância estatística como fator protetor da progressão das lesões cervicais para a malignidade.

Palavras chave: Lesão Cervical. Metaloproteinase de matriz 2. Polimorfismo. Papillomavírus Humano.

ABSTRACT

Cervical cancer is a global health problem being the fourth most incident cancer in women. This type of cancer is associated with prior infection with Human Papillomavirus (HPV) in almost all cases. Some cofactors act with HPV in the development of lesions and posterior cervical carcinoma. An important cofactor are matrix metalloproteinases (MMP). Proteolytic enzymes that participate in the lysis component of the extracellular matrix (ECM). Particularly MMP-2 excels in cervical cancer progression by promoting the intraepithelial lesions to invasion due to lysis of the basal membrane. Polymorphisms in the promoter region of the MMP-2 gene has been associated with increased risk of progression to cancer and metastasis. This study aimed to evaluate the possible association of single nucleotide polymorphisms (SNP) -1306C / T and -735C / T, present in the promoter region of the MMP-2 gene in cervical lesions in women in States of northeastern Brazil. We evaluated 52 cases of low grade intraepithelial lesions (LSIL) and 67 cases of high grade (HSIL) for the polymorphism -1306 C/T. While other 63 LSIL cases and 73 HSIL cases were evaluated for SNP -735C/T. 95 cases with normal cytology were selected with the control group -1306C / T and 91 cases for the -735 C / T. Gene amplification and subsequent genotyping were performed by PCR-RFLP. For this we used the restriction enzyme Pvu II (for SNP-1306C / T) and Hinf I (for SNP -735C / T). The MMP-2 C1306T showed no significant association between the LSIL group and the control ($p = 0,1734$ OR = 0:37; 95% CI = 0.3-1.58). As well as between the control group and HSIL ($p = 0.7118$ OR = 0:08; 95% CI = 0.93-3.3). The same was observed for the evaluation of MMP-2 compared C735T LSIL group and the control group ($p = 0.7948$, OR = 0.94; 95% CI = 0.56 to 2.15). There was also no association between HSIL group and the control ($p = 0.7398$; OR = 1.07; 95% CI = 0.50 to 1.64). The presence of the TT genotype in recessive model was presented as a protective factor in the progression of cervical lesions ($p = 0.03566$; OR = 0.66; 95% CI = .10-.96). Regarding the use of oral contraceptive as a cofactor, no significant associations found between LSIL cases ($p = 0.370$ OR = 0.65; 95% CI = 0.35-1.93) and HSIL ($p = 0.6527$; OR = 0:08; 95% CI = 0.93-3.3) from -1306C / T group, as well as LSIL ($p = 0.57649$; OR = 0.9; 95% CI = 0.60-2.54) and HSIL ($p = 0.6269$, OR = 0 74; 95% CI = 0:47 to 1:57) of -735C / T group. The association between HPV infection and the C735T and C1306T genotypes was not significant ($p > 0.05$). In the present study, only the presence of the TT genotype of MMP-2 C735T showed statistically significant protective factor in the progression of cervical lesions to malignancy.

Keywords: Cervical Lesion. Matrix metalloproteinase 2. Polymorphism. Human Papillomavirus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativa do câncer cervical no mundo para o ano de 2012. WHO, 2014.....	17
Figura 2 - Estimativas dos números (milhares) de novos casos de câncer (incidência) e mortes (mortalidade) em mulheres em regiões mais desenvolvidas e menos desenvolvidas. Ferlay <i>et al</i> , 2015.....	17
Figura 3 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o ano de 2014, exceto pele não melanoma. INCA, 2014.....	19
Figura 4 - Ciclo viral dos HPV de alto risco no câncer de colo uterino.....	21
Figura 5 - Representação dos mecanismos oncogênicos utilizados pela proteína viral E7 para burlar os mecanismos de controle do ciclo da fase G1/S.....	24
Figura 6 - Representação dos mecanismos oncogênicos utilizados pela proteína viral E6 para burlar os mecanismos de controle do ciclo da fase G1/S, ao estimular a degradação da proteína supressora de tumor p53.....	25
Figura 7 - Imagem representativa da formação molecular comum as MMP.	30
Figura 8 - Representação dos componentes celulares envolvidos no microambiente tumoral e as respectivas MMP que liberam no meio extracelular.....	37
Figura 9 - Representação da participação MMP-2 na progressão tumoral... ..	39
Figura 10. Representação esquemática do polimorfismo -735 C/T, após a amplificação e digestão enzimática.....	46
Figura 11. Representação esquemática do polimorfismo -1306 C/T, após a amplificação e digestão enzimática.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Primers utilizados para a detecção e genotipagem do HPV.....45

Tabela 2- Relação dos oligonucleotídeos (*Primers*) utilizados para a avaliação dos polimorfismos gene da MMP-2.....47

ARTIGO 01

Tabela 1- Primers utilizados para a detecção e genotipagem do HPV.....61

Tabela 2- Características gerais das pacientes caso (LSIL e HSIL) e controle.....61

Tabela 3- Polimorfismo de MMP-2 (SNP -1306) em pacientes com lesões de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL) e pacientes saudáveis com o uso de anticonceptivo oral como cofator.....61

Tabela 4- Polimorfismo da MMP-2 C1306T em pacientes com lesões cervicais de baixo (LSIL) e alto grau (HSIL) com o uso do tabaco como cofator.....62

Tabela 5- Distribuição da incidência viral nas lesões cervicais nas amostras avaliadas.....62

Tabela 6- Polimorfismo de MMP-2 (SNP -1306) em pacientes com lesões cervicais de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL) e pacientes saudáveis (grupo controle).....64

Tabela 7- Polimorfismo -1306C/T em lesões cervicais de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL) e a infecção pelo HPV.64

Tabela 8- Polimorfismo -1306C/T em lesões cervicais de baixo (LSIL) e alto grau (HSIL) e a infecção pelo HPV 16.....65

ARTIGO 02

Tabela 1- Primers utilizados para a detecção e genotipagem do HPV.....84

Tabela 3- Características gerais das pacientes caso (LSIL e HSIL) e controle.
.....84

Tabela 3- Polimorfismo de MMP-2 (SNP -1306) em pacientes com lesões de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL) e pacientes saudáveis com o uso de anticoncepcivo oral como cofator.....85

Tabela 4- Polimorfismo da MMP-2 C735T em pacientes com lesões cervicais de alto grau (HSIL) com o uso do tabaco como cofator.85

Tabela 5- Distribuição da incidência viral nas lesões cervicais nas amostras avaliadas.....85

Tabela 6- Polimorfismo de MMP-2 (SNP -735) em pacientes com lesões de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL) e pacientes saudáveis (grupo controle).
.....87

Tabela 7- Polimorfismo de MMP-2 (SNP -735) em pacientes com lesão intraepitelial e pacientes saudáveis.....87

Tabela 8- Polimorfismo da MMP-2 C735T em pacientes com lesões cervicais de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL) infecção pelo HPV 16.88

Tabela 9- Polimorfismo -735C/T em lesões cervicais de baixo grau (LSIL) e a infecção pelo HPV 1688

Tabela 10- Polimorfismo -735C/T em lesões cervicais de alto grau (HSIL) e a infecção pelo HPV 16.89

LISTA DE GRÁFICOS

ARTIGO 01

Gráfico 1- Distribuição em valores absolutos dos perfis dos HPV encontrados nas lesões cervicais com infecções únicas. Outro HPV*- Outros tipos virais que não foram identificados pelos *primers* específicos.....63

Gráfico 2- Distribuição em valores absolutos dos perfis dos HPV encontrados nas lesões cervicais com infecções virais múltiplas.....63

ARTIGO 02

Gráfico 1- Distribuição em valores absolutos dos perfis dos HPV encontrados nas lesões cervicais com infecções únicas. Outro HPV*- Outros tipos virais que não foram identificados pelos *primers* específicos.....86

Gráfico 2- Distribuição em valores absolutos dos perfis dos HPV encontrados nas lesões cervicais com infecções virais múltiplas.....86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A- Adenina

ASC-H- *Atypical squamous cells – cannot exclude HSIL* (Atipia celular de significado indeterminado não podendo se excluir uma lesão de alto grau)

ASC-US- *Atypical squamous cells of undetermined significance* (Atipia celular de significado indeterminado)

C- Citosina

CDK- Ciclina Dependente de Quinase

CDKI- Inibidor de Ciclina Dependente de Quinase

dbSNP- *Single Nucleotide Polymorphism Database*

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

E2F- Fator de Transcrição E2F

G- Guanina

HDAC- Proteínas Histonas Deacetilases

HPV- Papilomavírus humano

HSIL- *High-grade Squamous Intraepithelial Lesions* (Lesão intra-epitelial de alto grau)

INCA- Instituto Nacional de Câncer

INK4A- Inibidor de Kinase 4 A

LCR- Longa Região de Controle

LSIL- *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions* (Lesão intra-epitelial de baixo grau)

ME- Membrana Basal

MEC- Matriz Extracelular

mRNA- RNA mensageiro

NaCl- Cloreto de Sódio

NIC- Neoplasia Intra-Epitelial Cervical

pb- Pares de base

PBS- Phosphate buffered saline (Tampão fosfato-salino)

PCR- Reação em Cadeia de Polimerase

PDGF- Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

pRb- Proteína do Retinoblastoma

RNA- Ácido Ribonucléico

SDS- Duodecil Sulfato de Sódio

SNP- Single nucleotide polymorfism (Polimorfismo de nucleotídeo único)

T- Timina

TERT- Transcriptase Reversa de Telomerase

VEGF- Fator de Crescimento Endotelial Vascular

WHO- World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. Epidemiologia do Câncer de Colo de Útero.....	18
2.2. Papilomavírus humano (HPV): Ciclo Viral e Carcinogênese Cervical	21
2.3. Cofatores Associados ao Câncer Cervical	28
2.4. Metaloproteinases de Matriz (MMP) Estrutura e Ativação Enzimática	30
2.5. MMP Regulação, Fisiologia e Carcinogênese	33
2.6. Metaloproteinase 2 na Carcinogênese Cervical	41
3. OBJETIVOS	44
3.1. Objetivo Geral	44
3.2. Objetivos Específicos	44
4. MÉTODOS	45
4.1. Grupo de estudo.....	45
4.2. Aspectos Éticos	45
4.3. Obtenção das Amostras	46
4.5. Análise Genética	47
4.5.1. Análise Genética do Polimorfismo C-1306T da MMP-2.....	47
4.5.1. Análise Genética do Polimorfismo C-735T da MMP-2.....	48
4.6. Análise Estatística.....	49
4.6.1. Análise dos Dados Sócio-Demográficos	49
4.6.2. Análise dos Polimorfismos.....	49
5. RESULTADOS	51
AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO POLIMORFISMO -1306 C/T NO PROMOTOR GÊNICO DA METALOPROTEINASE DE MATRIZ 2 EM LESÕES CERVICAIS DE MULHERES NA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL	51
POLIMORFISMO NO PROMOTOR DA METALOPROTEINASE DE MATRIZ 2 (-735 C/T) COMO FATOR PROTETOR DA PROGRESSÃO DAS LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS EM MULHERES DO NORDESTE DO BRASIL	74
7. CONCLUSÃO.....	97
REFERÊNCIAS.....	98
ANEXO A- PARECER CONSUBSTANCIADO CEP/CCS/UFPE	111
ANEXO B- PROTOCOLO DE PESQUISA CEP-HUOC/PROCAPE	113

1. APRESENTAÇÃO

A neoplasia do colo uterino desponta como uma das principais causas de câncer e óbitos em mulheres em todo o mundo (WHO, 2014). Uma significativa representação dessa incidência concentra-se nos países em desenvolvimento, com cerca de 85% de todos os diagnósticos reportados (WHO, 2013).

No Brasil, nos últimos quatro anos, houve um discreto decréscimo no que diz respeito aos novos diagnósticos, de 17.530/100 mil (9.3%) para 15.590/100 mil (5.7%), caindo da posição de segundo para terceiro entre as neoplasias femininas (INCA, 2011, 2014).

O desenvolvimento das lesões intra-epiteliais e carcinoma escamoso têm a etiologia comprovada e em quase a totalidade dos casos há uma infecção prévia e persistente pelo Papilomavírus humano (HPV) de alto risco, o que geralmente acontece nos primeiros anos da vida sexual (ZUR HAUSEN, 1991, 2002).

No entanto, isoladamente a presença viral não assegura a carcinogênese cervical (MATSUMOTO & YOSHIKAWA, 2013). Diversos cofatores atuam em consonância aos mecanismos virais, a fim de estabelecer a iniciação da neoplasia do colo uterino (GREEN et al, 2007;APPLEBY et al, 2009) .

Compondo parte importante dos cofatores destaca-se a ação da família das metaloproteinases de matriz (MMP) (MILES & SIKES, 2014). Essas importantes enzimas proteolíticas atuam no remodelamento da matriz extracelular na homeostase (NISSINEN & KÄHÄRI, 2014), manutenção e progressão da massa tumoral, com dissolução da matriz extracelular (MEC), liberação de fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas, formação de metástase e no recrutamento de células endoteliais na angiogênese (GHOSH et al., 2014; YADAV et al., 2013). Nas neoplasias compõem o microambiente heterogêneo em que se insere o tumor neoplásico (ZHANG et al., 2014).

Na progressão do câncer cervical, a atuação das MMP se dá em especial pela ação da metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) (BALTAZAR-RODRIGUEZ et al., 2008). Trabalhos prévios têm demonstrado uma forte associação entre a expressão crescente da MMP-2 com o aumento da

invasividade das células tumorais cervicais (TURPEENNIEMI-HUJANEN, 2005; DERYUGINA; QUIGLEY, 2006;), bem como aumento na expressão de mRNA proporcionais ao estágio do tumor, diferentemente da relação inversa a expectativa de sobrevida das pacientes (DAVIDSON et al., 1999).

Determinadas particularidades inerentes ao hospedeiro, como a presença de polimorfismos genéticos podem participar como cofatores individuais na facilitação do desenvolvimento tumoral, atuando em conjunto com os oncogenes virais na progressão do tumor (XIE et al., 2015).

No entanto, ainda são escassos os trabalhos que se debruçam em avaliar a associação de polimorfismos de base única na região promotora do gene da MMP-2 na progressão da carcinogênese cervical, bem como a avaliação do seu possível potencial como alvo terapêutico.

Desta maneira, o presente trabalho propõe-se a avaliar a contribuição dos polimorfismos -1306 C/T e -735 C/T para o risco de desenvolvimento de lesões intraepiteliais e carcinoma cervical.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Epidemiologia do Câncer de Colo de Útero

A despeito dos dados epidemiológicos terem demonstrado uma diminuição das taxas de novos casos de câncer cervical nas últimas três décadas, a incidência do câncer de colo do útero permanece elevada (WHO, 2014).

Com aproximadamente 528.000 novos casos e, cerca de 266.000 mortes estimadas para o ano de 2012, o câncer cervical figura como a quarta causa neoplásica de maior incidência em mulheres ao redor do mundo (WHO, 2013, 2014), sendo as áreas de maior representatividade de novos diagnósticos, com mais de 85% dos casos, aquelas ocupadas pelos países em desenvolvimento (WHO, 2014). Quando avaliados apenas os dados desses países, o câncer cervical desponta como a segunda causa neoplásica em mulheres com 445.000 casos (FERLAY et al., 2015).

As regiões em desenvolvimento que correspondem a América do Sul (20,4/100,000), Centro-Sul da Ásia (19,3/100,000), Melanésia (33,3/100,000), África Oriental (42,7/100,000), Sul da África (31,5/100,000) e África Central (30,6 /100,000), apresentam taxas de incidência para a neoplasia do colo superiores as que são estimadas a nível mundial (14/ 100,000) (FERLAY et al., 2015) (figura 1).

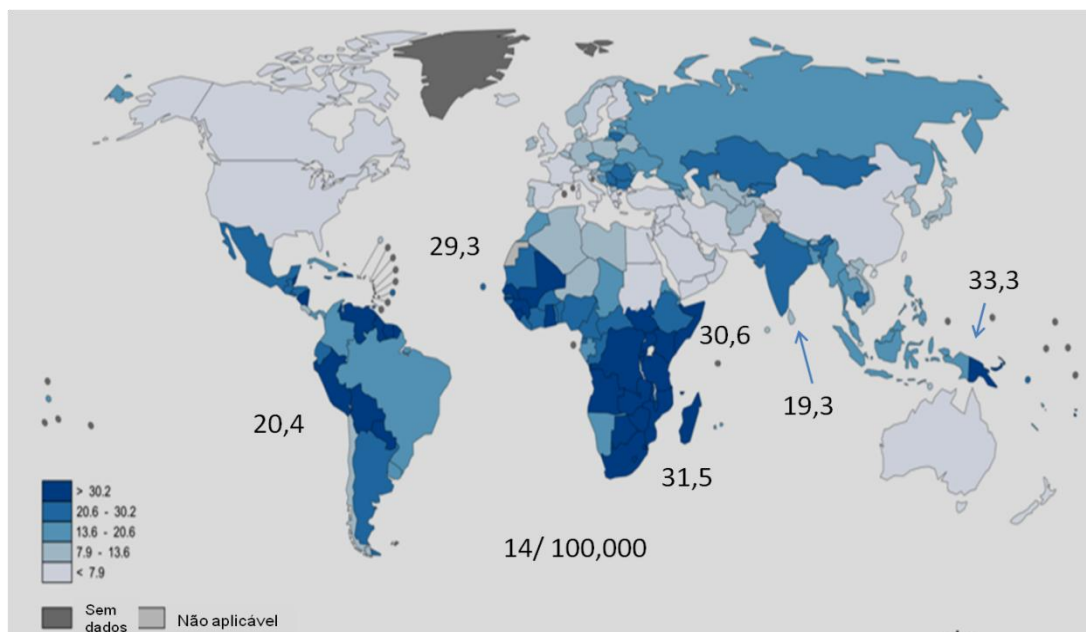


Figura 1. Estimativa do câncer cervical no mundo para o ano de 2012. Adaptado de World Health Organization (WHO), 2015 & Ferlay et al, 2015.

Os altos índices de incidência e mortalidade pelo câncer cervical em nações menos desenvolvidas tornam-se mais evidentes quando comparados com a distinta realidade apresentada pelas nações desenvolvidas, onde o câncer de colo ocupa apenas a 11^o posição (FERLAY et al., 2015). (Figura 2).

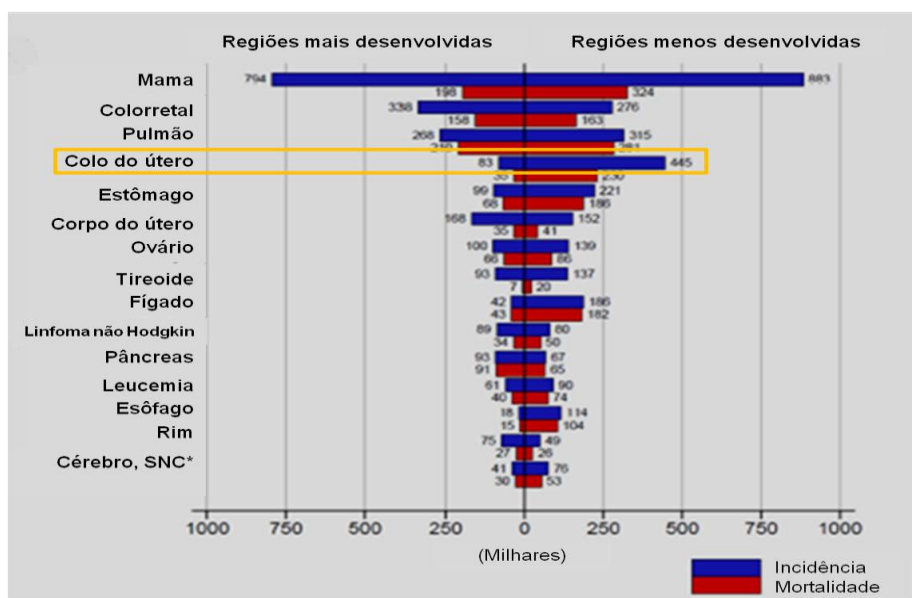


Figura 2. Estimativas dos números (milhares) de novos casos de câncer (incidência) e mortes (mortalidade) em mulheres em regiões mais desenvolvidas e menos desenvolvidas. Adaptado de FERLAY et al, 2015. *Sistema Nervoso Central.

Esse perfil díspar nos dados do câncer de colo entre os diferentes perfis de desenvolvimento das nações traduz diretamente os esforços e a organização dos respectivos sistemas de saúde em atuar no caráter preventivo da doença, ao investir em amplos programas de rastreio e prevenção das lesões iniciais do colo uterino (WHO, 2013, 2014).

Atrelados ao estado de pobreza da população, a baixa escolaridade, o comportamento sexual e aos hábitos de higiene, funcionam esses como critérios sócio-demográficos que influenciam a atual conjuntura da situação epidemiológica do câncer cervical em escala global (CAPOTE NEGRIN, 2015).

Quando analisado o atual panorama do continente americano, mais de 83.000 novos casos foram diagnosticados e aproximadamente 36.000 mortes para o ano de 2012 (PAHO, 2013a). Nas proporções de evolução atuais são estimados um acréscimo de 45% das mortes para o ano de 2030 em todo o continente (PAHO, 2013a).

No entanto, os índices de morbidade e mortalidade na América do Norte são inferiores aos mesmos parâmetros avaliados na América Latina e Caribe, sendo os números proporcionais de mortalidade na região Norte três vezes menores que no restante do continente, reflexo direto da organização, integralidade e qualidade de acesso ao diagnóstico e tratamento precoces das lesões cervicais iniciais (PAHO, 2013b).

Apesar dos dados desfavoráveis, taxas de mortalidade têm sofrido significativo decréscimo desde o início dos anos 2000 em 12 países. Com particular destaque para o Panamá e México, com redução da mortalidade de -5,3% e -4,6%, respectivamente (PAHO, 2013b).

A semelhança do que tem ocorrido nesses países, no Brasil os índices de incidência e mortalidade vêm apresentando um singelo decréscimo de 9.3% para 5.7% de novos casos estimados no ano de 2014, o que corresponde agora ao terceiro caso de câncer mais incidente em mulheres brasileiras (INCA, 2014) (figura 3).



	Localização primária	casos	%
Mulheres	Mama Feminina	57.120	20,8%
	Cólon e Reto	17.530	6,4%
	Colo do Útero	15.590	5,7%
	Traqueia, Bronquio e Pulmao	10.930	4,0%
	Glândula Tireoide	8.050	2,9%
	Estômago	7.520	2,7%
	Corpo do Útero	5.900	2,2%
	Ovário	5.680	2,1%
	Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
	Leucemias	4.320	1,6%

Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o ano de 2014, exceto pele não melanoma. Adaptado de INCA, 2014.

A incidência do câncer cervical demonstra-se heterogênea nas diferentes regiões do país, sendo o tipo de câncer feminino mais incidente na região Norte (19,0%), segundo colocado nas regiões Nordeste (10,4%) e Centro-Oeste (8,1%). Nas quartas e quintas posições nas regiões Sudeste (3,1%) e Sul (4,7%) (INCA, 2014).

Essas taxas corroboram inversamente ao índice de desenvolvimento humano (IDH) brasileiro, o que reflete as disparidades existentes no cuidado preventivo com a saúde entre as regiões, além do caráter indicativo de baixo desenvolvimento as quais as estimativas diagnósticas de câncer cervical podem estar associadas (PINTO; COSTA; MARQUES, 2013; CAPOTE NEGRIN, 2015).

2.2. Papilomavírus humano (HPV): Ciclo Viral e Carcinogênese Cervical

O Papilomavírus humano (HPV) consiste em um vírus de 52 a 55 nm de diâmetro, não envelopado e com estrutura capsular em formato icosaédrico (SANTOS-LÓPEZ et al., 2015). É formado por uma dupla fita de DNA circular de aproximadamente 8 Kb de tamanho, podendo ser dividido em três regiões: região dos genes de expressão precoce, do inglês *E “early”*, região dos genes de expressão tardia, do inglês *“late”* e a longa região de controle (LCR)(BIRYUKOV; MEYERS, 2015; ZUR HAUSEN, 2002).

A região precoce codifica seis comuns ORFs (*Open Read Frame*): E1, E2, E4, E5, E6 e o E7. A região tardia que codifica as regiões gênicas de

leitura em L1 e L2, é responsável pela síntese das proteínas do capsídeo (GURGEL et al., 2015). A longa região de controle é responsável pela origem da replicação viral e contém sítios de ligação de vários fatores de ligação, mas não detém a função de codificação de proteína (VENUTI et al., 2011; WILLIAMS et al., 2011).

Até o momento são conhecidos mais de 200 diferentes genótipos de HPV, baseado nas variações presentes na sequência do gene L1 do vírus (HALFON et al., 2013). Cerca de 40 afetam o trato genital feminino e destes, 15 são considerados de alto risco para o desenvolvimento de lesões cervicais e o câncer de colo uterino (MOODY; LAIMINS, 2010; CHAGAS et al., 2013a).

Os genótipos de baixo risco oncogênico são os responsáveis pelo aparecimento das verrugas genitais, mais conhecidos como condilomas acuminados, sendo os tipos virais 6 e 11 de baixo risco mais frequentes. Os vírus também podem ser classificados de acordo com o seu tropismo em: cutaneotrópico (que infectam a epiderme) e mucosotrópicos (que infectam as mucosas em geral) (IARC, 2007; UČAKAR et al., 2014).

Dos tipos de alto risco, o HPV16, HPV18, HPV31 e HPV33 estão associados com quase 80% de todos os casos de carcinoma cervical a nível mundial (SERRANO et al., 2015).

No Nordeste brasileiro, a distribuição viral apresenta um perfil genotípico ligeiramente diferenciado, com incidência elevada para os HPV58 e HPV35, além dos tipos supracitados. No Estado de Pernambuco, o HPV 18 apresenta-se em poucos casos de carcinoma cervical diagnosticados (CHAGAS et al., 2013a; FERNANDES et al., 2014; NUNES et al., 2014).

No trato genital feminino o vírus tem como porta de entrada o epitélio escamoso estratificado não queratinizado, localizado no colo do útero, precisamente nas células basais do epitélio (ZUR HAUSEN, 2002). Essas se tornam expostas por meio de microfissuras no epitélio que são provocadas nas relações sexuais ou por traumas mecânicos (DOORBAR et al., 2012).

Seguindo a infecção, os oncogenes virais induzem a reentrada das células parabasais na fase S do ciclo celular para replicar genomas de HPV em um processo chamado amplificação, produzindo aproximadamente 200 cópias do vírus por célula na forma episomal, mantendo desta maneira uma

expressão limitada dos genes E5, E6 e E7 (HELLNER; MÜNGER, 2011; WILLIAMS et al., 2011; DOORBAR et al., 2012).

Ao se dividirem, essas células infectadas distribuem equitativamente o DNA viral entre as células filhas (MOODY & LAIMINS, 2010). Uma das células filhas migra da camada basal e inicia o processo de diferenciação, com a expressão das proteínas estruturais de fase tardia (L1 e L2), com a liberação subsequente de partículas virais prontas para infectar outros sítios celulares na superfície do epitélio (ZUR HAUSEN, 2002). Enquanto a outra célula filha continua indiferenciada na camada basal, funcionando como reservatório de DNA viral (DOORBAR et al., 2012; UČAKAR et al., 2014) (Figura 4).

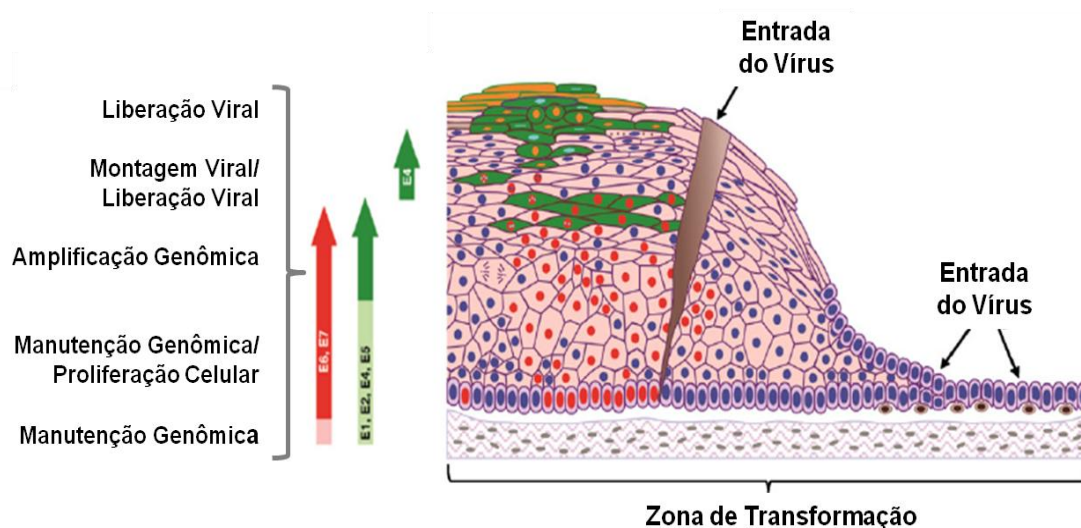


Figura 4. Ciclo viral dos HPV de alto risco no câncer de colo uterino. Epitélio escamoso estratificado da cérvice uterina com uma micro abrasão, e a junção escamocolumnar (JEC), são os locais de predileção da infecção inicial do vírus por conta da exposição de células com plena atividade mitótica, as células basais (setas). As diferentes colorações indicam o perfil de expressão dos genes virais ao longo da maturação celular. Ciclo que termina com a liberação de novos vírions, partícula viral com potencial infeccioso. Adaptado de: DOORBAR et al., 2012.

Estima-se que aproximadamente 80% das mulheres sexualmente ativas entrem em contato com o HPV ao longo da vida. No entanto, a maioria das infecções pelo vírus sofre remissão espontânea por *clearance* imune, o que pode levar de meses a anos, ou ainda, o vírus pode permanecer de forma latente no hospedeiro sem chegar a causar nenhum tipo de atipia tecidual (EINSTEIN et al., 2009; DA SILVA et al., 2014;).

O grande fator de risco para a carcinogênese cervical reside na persistência do vírus no organismo hospedeiro, com posterior transformação celular maligna (DOORBAR et al., 2012). A permanência da infecção é alcançada por meio de mecanismos refinados de escape imune e imunossupressão, lançados pelo HPV, que atuam na supressão de diversas vias imunes, como a cascata proteica pelas células de Langherhans e de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade de classe 1 (MHC de classe 1) (EINSTEIN et al., 2009; DA SILVA et al., 2014, 2015;).

Estima-se que apenas de 4-8% das mulheres infectadas pelo HPV irão desenvolver uma lesão pré-neoplásica (WHO, 2013). Isso ocorre devido à transformação maligna celular, que acontece quando o DNA viral sofre uma linearização do genoma mediante a clivagem e perda dos genes que controlam a replicação viral, e posterior integralização do genoma do vírus ao DNA do hospedeiro (BOSCH et al., 2001; UČAKAR et al., 2014) .

Os genes E1 e E2 são responsáveis por controlar a replicação viral, já que são os únicos com capacidade de codificar fatores de transcrição e atuar diretamente ligando-se a várias regiões reguladoras da LCR (DOORBAR et al., 2012; GALLOWAY & LAIMINS, 2015).

A perda dos genes E1 e E2 e a integralização dos genomas conduz o genoma viral a uma desregulação e consequente amplificação da capacidade proliferativa dos demais genes de fase precoce, em especial os genes E6 e E7, uma etapa crucial na gênese do câncer cervical (MOODY & LAIMINS, 2010; DOORBAR, 2015) .

Os aumentos intra-celulares dos produtos dos genes E6 e E7 induzem a proliferação e desregulação do ciclo celular o que leva a formação de rearranjos, aneuploidias e mutações que podem levar ao desenvolvimento de modificações malignas nas células do hospedeiro (ZUR HAUSEN, 2002; DE FREITAS; COIMBRA; LEITÃO, 2014).

A oncoproteína E7 tem como principal alvo na célula o gene RB1, que é um supressor de tumor localizado no cromossomo 13q14, que tem como produto a proteína celular do retinoblastoma (pRb). O gene do retinoblastoma está deletado ou mutado em muitas linhagens celulares tumorais (ASIH et al., 2015; DOORBAR, 2015).

A pRb normalmente previne a célula da entrada no ciclo celular e regula a transição da fase G1/S. Durante essa fase, a pRb encontra-se ligada ao fator de transcrição E2F, o qual atua na região promotora de diversos genes envolvidos com a progressão do ciclo celular, diferenciação, mitose e apoptose (ZUR HAUSEN, 2002; NAVARRO et al., 2013; DAS et al., 2015).

Na etapa final da fase G1, a pRb é fosforilada por meio da atividade de ciclinas dependentes de quinase (CDK), o que leva a ruptura do complexo pRb-E2F, permitindo a continuidade do ciclo. Nesse ponto, a oncoproteína E7 liga-se a pRb, impedindo o retorno do E2F ao ocupar o seu sítio de ligação, ação que promove a expressão contínua do E2F e a passagem prematura da fase G1/S. (MOODY & LAIMINS, 2010; NAVARRO et al., 2013).

Adicionalmente, o E7 interfere na atividade dos inibidores de CDK (CDKI), a p21 e p27, que são importantes reguladores do ciclo celular durante o processo de diferenciação epitelial. O principal alvo desses inibidores de quinase são as ciclinas A e E, respectivamente. Essas últimas estão envolvidas na liberação da passagem da fase G1/S, por meio da regulação da atividade catalítica da CDK2 nessa fase do ciclo (MOODY; LAIMINS, 2010; SANTO; SIU; RAJE, 2015).

A oncoproteína E7 liga seus domínios carboxi-terminais as CDKI, p21 e p27, neutralizando desta forma as suas funções inibitórias sobre as ciclinas A e E. Ligação essa que mantém os níveis elevados de CDK2, permitindo a contínua passagem do ciclo (YAN et al., 2010; PORTARI et al., 2013; ŽIVADINOVIĆ et al., 2014). Como demonstrado na figura 5 abaixo.

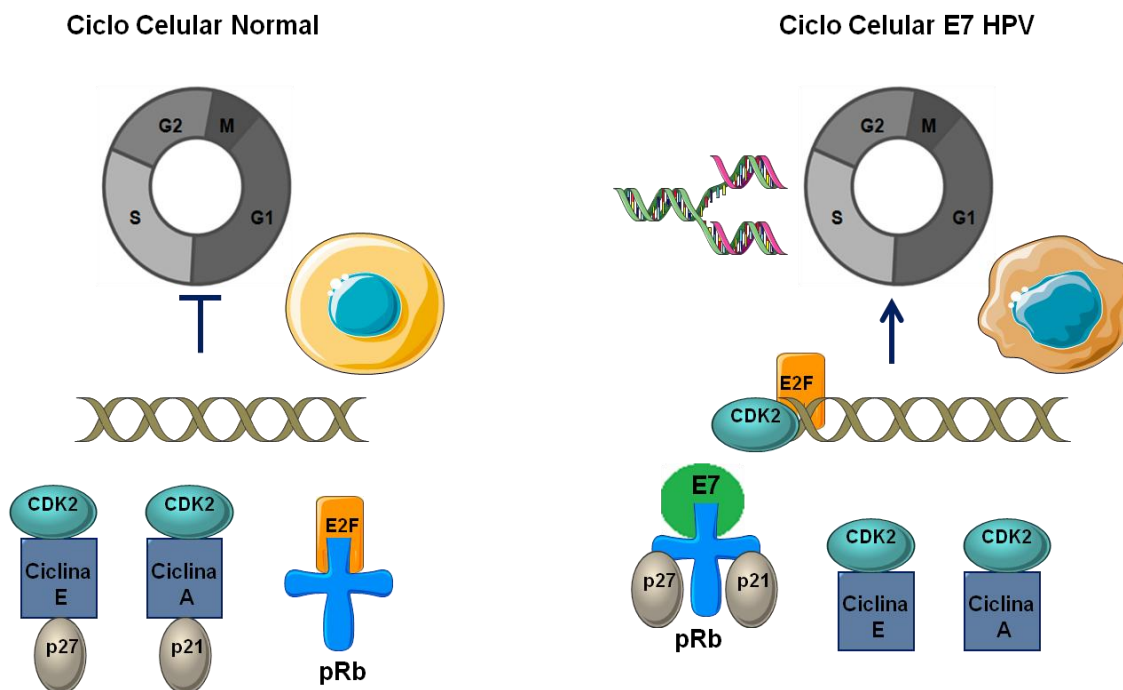


Figura 5. Representação dos mecanismos oncogênicos utilizados pela proteína viral E7 para burlar os mecanismos de controle do ciclo da fase G1/S. A imagem à esquerda representa o funcionamento dos mecanismos homeostáticos de controle da progressão do ciclo celular. A pRb permanece ligada ao fator de transcrição E2F até o final da fase G1. Assim como, as proteínas p21 e p27 mantêm as ciclinas A e E, respectivamente, ligadas as CDKs impedindo a progressão do ciclo celular para a fase S. A imagem à direita ilustra o mecanismo de atuação da oncoproteína E7 no ciclo celular. O E7 liga-se à proteína pRb de forma permanente, impedindo o retorno do fator E2F ao pRb e permitindo a contínua transcrição do DNA hospedeiro. As CDKs são neutralizadas pelo HPV de alto risco por meio da ligação aos domínios carboxi-terminais de E7, o que permite a contínua progressão do ciclo celular. Fonte: Autora.

O E7 também contribui para a imortalização celular através da interação com proteínas histonas deacetilases (HDACs). A ligação entre as proteínas ocorre em sítios distintos daquele usados para interagir com a pRb. Dessa forma, reprime a atuação das HDACs, o que facilita a ligação de fatores de transcrição a sequências promotoras do DNA do hospedeiro (LONGWORTH & LAIMINS, 2004; LONGWORTH; WILSON; LAIMINS, 2005; MOODY & LAIMINS, 2010).

Um dos principais efeitos da atuação do complexo pRb-E7 é o aumento da expressão da proteína supressora de tumor p53, a qual exerce atividade ao detectar eventuais danos que possam ocorrer ao DNA nos pontos de checagem do ciclo (*checkpoints*). A p53 conduz a célula para a correção da mutação através da ativação de mecanismos proteicos de reparo ou a indução a apoptose. Atividade essa, que impede diretamente as intenções de

imortalização celular dos queratinócitos pela ação da oncoproteína viral E7 (SINGH; PATEL; PATEL, 2015; NATARAJAN et al., 2016).

Concomitante aos aumentos celulares de p53, há o estímulo pelo aumento da expressão proteica da E6, que interfere diretamente nas funções protetoras da p53 (GANTI et al., 2015). A oncoproteína E6 atua ao recrutar a ubiquitina E3 ligase associada à proteína E6 (E6AP), seguida pela ubiquitinação e posterior degradação proteossômica da proteína p53 (BERNARD et al., 2011; RASTOGI et al., 2015).

A ausência da p53 resulta na resistência da célula à apoptose e o aumento da instabilidade cromossômica por acúmulo de mutações no genoma da célula hospedeira (ZUR HAUSEN, 2002; BUITRAGO-PÉREZ et al., 2009; KENNEDY et al., 2014) (Figura 6).

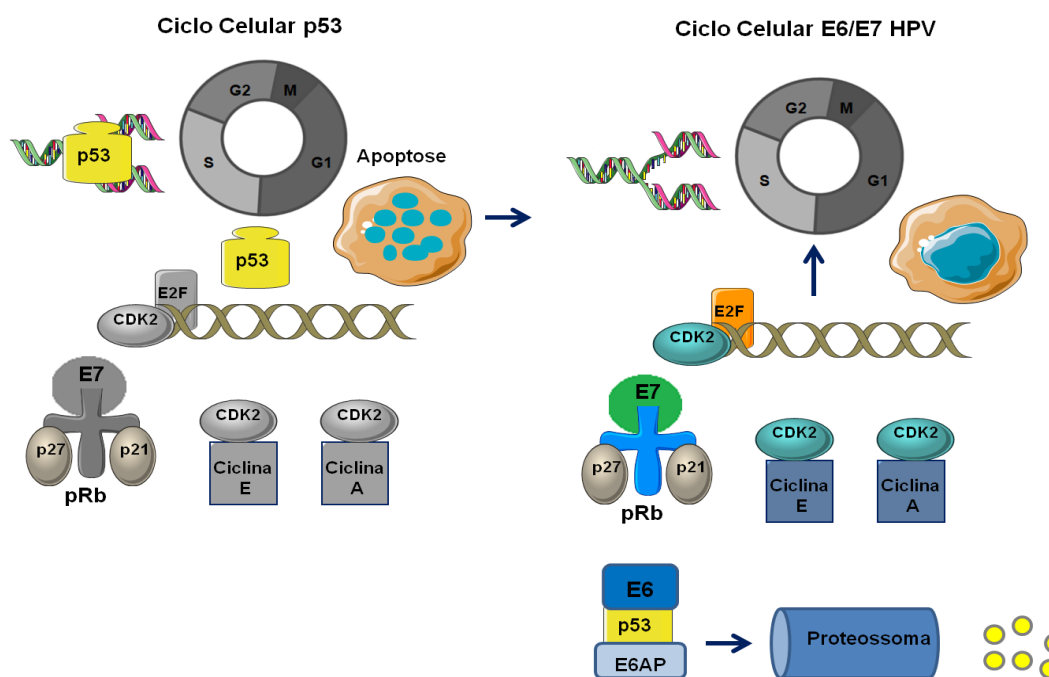


Figura 6. Representação dos mecanismos oncogênicos utilizados pela proteína viral E6 para burlar os mecanismos de controle do ciclo da fase G1/S, ao estimular a degradação da proteína supressora de tumor p53. As alterações nos pontos de checagem do ciclo celular pelo E6 são refletidas no aumento concomitante da p53, que inibe a progressão da divisão celular, bem como, encaminha a célula mutada para a apoptose (imagem à esquerda). No entanto, esse mecanismo de controle dispara a maquinaria oncogênica de atuação da proteína E6. Esta, estimula a formação do complexo de ubiquitinação E6AP que ligar-se-á a proteína p53 formando um complexo ubiquitina ligase que é posteriormente degradado, impedindo a correção dos erros de transcrição e permitindo a contínua progressão do ciclo (imagem à direita). Fonte: Autora.

2.3. Cofatores Associados ao Câncer Cervical

É sabido que a infecção e persistência do HPV no epitélio cervical é um fator necessário para o desenvolvimento do câncer de colo do útero. Contudo, o longo tempo que decorre entre o primeiro contato com o vírus e o aparecimento das primeiras lesões pré-neoplásicas sugere que cofatores estejam atrelados como facilitadores dos mecanismos oncogênicos do Papilomavírus humano (DE FREITAS et al., 2012; CHAGAS et al., 2013b).

Diversos trabalhos têm sugerido que o uso prolongado de anticoncepcionais orais, tabagismo, co-infecções por *Chlamydia trachomatis* e Herpes simplex, determinados grupos do HLA e componentes genéticos devem estar associados à infecção viral para que as lesões pré-neoplásicas e o câncer possam se estabelecer (MORENO et al., 2002; MATSUMOTO et al., 2003; CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ; OTHERS, 2003; EINSTEIN et al., 2009).

Em relação ao tabagismo, estudos do tipo caso controle têm demonstrado a elevação do risco no desenvolvimento de carcinoma escamoso em mulheres HPV positivas que têm o hábito de fumar (CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ; OTHERS, 2003). Sendo o risco estimado de duas a cinco vezes maior em relação àquelas que nunca haviam fumado (RAJKUMAR et al., 2006).

Uma das hipóteses lançadas é a de que o uso do tabaco interfere na imunidade. Isso porque, há uma diminuição da atividade das células de Langherhans, principais células da resposta inata na mucosa cervical. Da mesma maneira o tabaco modula negativamente a atividade e liberação de mediadores químicos, como as citocinas (CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ; OTHERS, 2003; CHAGAS et al., 2013b).

Além disso, resultados recentes têm demonstrado uma associação significativa entre a presença de polimorfismos nos receptores Toll-Like em pacientes tabagistas, com diagnóstico de carcinoma cervical, em relação ao grupo controle não fumante (ZIDI et al., 2015). Em conjunto, esses achados sustentam a possibilidade de ser o tabaco, o fator de risco mais relevante para o desenvolvimento da carcinogênese cervical (RIECK; FIANDER, 2006).

A participação de outros agentes infecciosos de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), como a *Chlamydia trachomatis* e o Herpes simplex, têm

sido destacada, em especial, na facilitação da entrada viral no epitélio escamoso do colo. Assim como na facilitação do escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro na tentativa de depleção da infecção (SMITH et al., 2002; MATSUMOTO et al., 2003).

A atuação da *Chlamydia trachomatis* como cofator na carcinogênese cervical tem sido relacionada a sua capacidade de facilitar o encontro do HPV com as células infectáveis na camada basal de epitélio. Isso porque a lise das células infectadas faz parte do seu ciclo biológico natural (MATSUMOTO et al., 2003; IGIETSEME et al., 2015).

A infecção pela *Chlamydia trachomatis* também conduz o epitélio cervical a um estado inflamatório crônico, com intensa produção de radicais livres. Em consonância com uma contínua atividade mitótica, motivada pelos fatores de crescimento, estimulados pelo processo metaplásico (BHATLA et al., 2013; LANJOUW et al., 2015).

Trabalhos conduzidos em diversos países, avaliaram que o número de pacientes soroprevalentes para o Herpes vírus simplex (HSV) tipos 1 e 2 foram significativamente maiores nos grupos que já possuíam o carcinoma escamoso ou o adenocarcinoma invasor do que com o grupo controle. Em especial, nos grupos infectados pelo HSV 2. Sugerindo que a infecção por HSV pode atuar conjuntamente ao HPV e aumentar o risco de desenvolvimento de malignidade (THOMAS et al., 2001; CAO et al., 2014).

Um trabalho com linhagens celulares de câncer cervical, demonstrou que o HSV 1 e 2 modularam negativamente a expressão de uma importante proteína envolvida na proteção da mucosa cervical, um inibidor de protease de leucócito (SLP1). Esta última, desempenha atividade antibiótica em mucosas, incluindo a do trato genital inferior. Podendo ser inferido um outro mecanismo pelo qual o HSV compromete as ações da imunidade inata (JOHN et al., 2005; FAKIOGLU et al., 2008).

O uso de hormônios esteroides exógenos para fins de contracepção tornou-se popular na década de 1960. Desde então, a preocupação acerca da segurança do seu uso, bem como a adjuvância do mesmo nas neoplasias vêm sendo o tema de diversos estudos, como a sua associação com o câncer cervical e o HPV (VANAKANKOVIT; TANEERANICHSKUL, 2008).

Diversos trabalhos avaliaram a possível influência do uso prolongado dos anticoncepcionais orais e o risco de desenvolvimento neoplásico. Foi visto que há um aumento do risco em três vezes no surgimento da carcinogênese cervical quando o uso do anticoncepcional é feito por cinco anos ou mais (MORENO et al., 2002; GREEN; OTHERS, 2007; CHAGAS et al., 2013b).

Componentes genéticos do sistema imune também têm sido associados às chances aumentadas de câncer cervical. Em particular, trabalhos demonstram particular associação dos haplótipos/alelos dos genes do HLA de classe II (em particular os haplótipos DQB01, DQB02 e DQB03) com o câncer cervical. Contudo, poucos são os trabalhos que se debruçam no estudo do HLA classe I e a oncogênese cervical provocada pelo HPV (HILDESHEIM; WANG, 2002; MATSUMOTO; YOSHIKAWA, 2013).

A influência de componentes e variantes genéticas presentes no hospedeiro vêm sendo descritos como importantes fatores, junto com o HPV, na participação do desenvolvimento maligno das células do epitélio cervical. No entanto, poucos trabalhos têm explorado os possíveis papéis desses cofatores, bem como o papel dos polimorfismos na história natural das lesões cervicais (LAI et al., 2005; MATSUMOTO; YOSHIKAWA, 2013; MAGAÑA-CONTRERAS et al., 2015).

2.4. Metaloproteinases de Matriz (MMP) Estrutura e Ativação Enzimática

A matriz extracelular (MEC) consiste em uma malha tridimensional composta por componentes celulares e por uma variedade de famílias de moléculas, compreendendo polissacarídeos (hialuron e glicosaminoglicanos) e proteínas fibrosas (elastina, colágenos, laminina, fibronectina) (ORTEGA; WERB, 2002; BIDAN et al., 2015).

A MEC desempenha importância primordial na manutenção dos tecidos, ao prover a integridade e elasticidades necessárias ao bom funcionamento das diferentes estruturas teciduais. Além de estar envolvida como mediadora de diversos processos bioquímicos, sabidamente existentes entre a MEC e os tecidos (KARSDAL et al., 2013; SWINEHART; BADYLAK, 2015).

A membrana basal (MB) faz parte de uma especialização da MEC, a chamada matriz pericelular, que participa mais diretamente do contato com as

células. A MB dispõe-se como uma fina camada a qual faz a interface entre o parênquima tecidual e o tecido conectivo adjacente, já que funcionalmente delimita o tecido sob o qual está assentada, evitando eventuais rupturas mecânicas. É constituída principalmente pelo colágeno tipo IV, a laminina e entactina/nidogen (KARSDAL et al., 2013; THEOCHARIS et al., 2015).

Podendo a MEC atuar como matriz adesiva, ao funcionar como trilha para células migratórias e sensora e transdutora de sinal, no processo de permissividade da diferenciação celular, na sinalização intracelular, através da interação com os receptores de superfície e modificações do citoesqueleto. Além de ser importante fonte e reguladora de armazenamento de fatores de crescimento e seus respectivos receptores, mediante interação celular específica e/ou degradação proteolítica, (ROZARIO; DESIMONE, 2010).

Todas essas atividades são dependentes diretos da constante manutenção e remodelamento da estrutura e abundância da MEC, que são necessárias para a homeostasia tecidual. A degradação específica de componentes da MEC é feita por cinco famílias de proteases distribuídas intra e extra celularmente, compreendendo: as metaloproteases, as serinas proteases, as cisteínas proteases, as ácido aspártico proteases e as treoninas proteases (THEOCHARIS et al., 2015).

Em especial, a grande família de proteases formada pelas metaloproteinases de matriz (MMP) desempenha importante repercussão fisiológica ao clivarem especificamente componentes da MEC. Atividades essas que modulam a biodisponibilidade de fatores de crescimento, a migração celular, a angiogênese, entre outros. Além das ações envolvidas em processos patológicos, como os presentes na inflamação e no câncer (GIANNANDREA; PARKS, 2014; NISSINEN; KÄHÄRI, 2014; SWINEHART; BADYLAK, 2015).

As MMPs são enzimas proteolíticas zinco dependentes, pertencente à superfamília das metzincinas, capazes de degradar quase todos os elementos proteicos que compõem a matriz extracelular (MEC). Além das funções no remodelamento do espaço intersticial, as MMPs desempenham outros papéis fundamentais na manutenção da homeostasia ao atuar na embriogênese, cicatrização de feridas e angiogênese (VIHINEN and KAHARI, 2002; YADAV et al, 2014).

São conhecidos até o momento 24 tipos de MMPs diferentes, divididas em 6 grupos conforme o seu substrato em: collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelinas (MMP-3 e MMP-10), matrilisinas (MMP-7 e MMP-26), MMPs tipo membrana (MT-MMP-14, MT-MMP-15, MT-MMP-16, MT-MMP-17, MT-MMP-24 e MT-MMP-25) e outras MMP (EGBLAD and WERB, 2002; YADAV et al, 2014).

Estruturalmente as MMP são proteínas multidomínio com uma composição baseada em uma sequência de um pró-peptídeo, um domínio catalítico zinco (Zn^{2+}) dependente, uma região de dobradiça ligante de peptídeo e um domínio de hemopexina. Adicionalmente, as MMPs contêm um pró-domínio cisteína interruptor, cujo grupo sulfidril age como quelante do sítio ativo de ligação ao Zn^{2+} , mantendo desta maneira as MMPs na sua forma de zimógeno não ativo (pró-MMP) (EGEBLAD; WERB, 2002; YOON et al., 2003; MACCOLL; KHALIL, 2015).

Além de um motivo Zn^{2+} ligante, ligado por meio de três histidinas com sequências conservadas (HEXXHXXGXXH), há um glutamato e a uma metionina conservados. Esta última oriunda de uma sequência XBMX (metionina modificada) que se localiza a oito resíduos adjacentes a região ligante do Zn^{2+} e auxilia a região que cerceia o domínio Zn^{2+} catalítico (YOON et al., 2003; MACCOLL; KHALIL, 2015) (Figura 7).

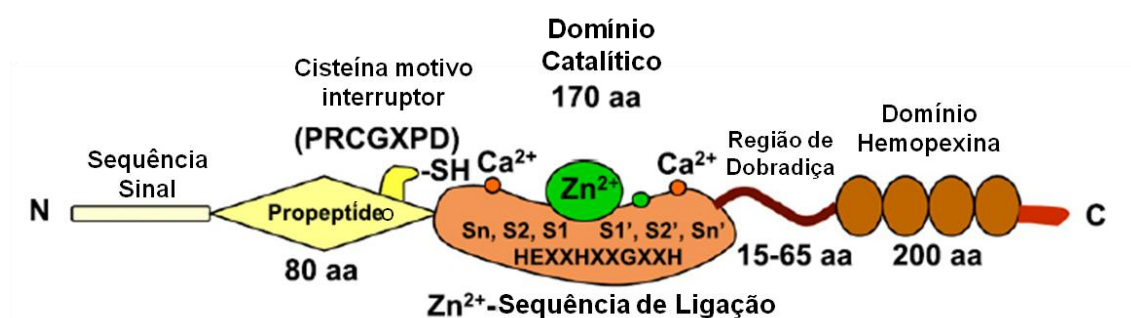


Figura 7. Imagem representativa da formação molecular comum as MMP. Constituída por um domínio pró-peptídeo, um domínio catalítico de ligação ao Zn^{2+} , o qual se liga a uma região de dobradiça que faz a comunicação com o domínio conservado de hemopexina. Adaptado de: (MACCOLL; KHALIL, 2015).

Essas proteases são sintetizadas como pré-pró-MMP, das quais o peptídeo sinal é removido resultando na forma pró-MMP, estado ainda inativo. Para a bioatividade dessas enzimas é necessário a remoção enzimática do grupo cisteína-sulfidril ligado ao sítio catalítico Zn^{2+} dependente (MACCOLL; KHALIL, 2015). A maioria das ativações das MMP é feita no ambiente extracelular por outras MMP, com exceção das MT-MMP que têm sua ativação no meio intracelular por serinas proteases ou furinas convertases (PAHWA; STAWIKOWSKI; FIELDS, 2014).

2.5. MMP Regulação, Fisiologia e Carcinogênese

O amplo nicho de atividades desenvolvidas pelas MMP requer um sistema de regulação refinado e coordenado por diferentes esferas de controle, já que níveis desregulados das metaloproteínas podem representar um risco elevado à constância da homeostasia. Os pontos de controle que podem ser elencados são: a regulação da expressão gênica (incluindo modificações epigenéticas), a localização celular e tissular de liberação da MMP (compartimentalização), ativação da pró-enzima por remoção enzimática do pró-domínio, por estresse oxidativo ou fosforilação, e inibição por inibidores teciduais de metaloproteinase de matriz, os TIMP (CHANG et al., 2015; GAFFNEY et al., 2015; NAVRATILOVA; KOLEK; PETREK, 2015).

Os controles na expressão gênica podem atuar a nível de regulação transcricionais e pós transcricionais, ao modular os níveis de mRNA por meio de citocinas e miRNA. Como no caso do uso da IL-10 no tratamento de osteoartrite, ao aumentar os níveis de expressão do mRNA de MMP-13, bem como ao elevar os níveis de expressão proteica da MMP. Em contrapartida, níveis dos miRNA-411 e miRNAa-222 estão associados a baixos níveis de expressão das MMP em patologias que envolvem as MMP de natureza inflamatória (SONG et al., 2015; WANG et al., 2015).

No cerne da epigenética, alterações do balanço MMP/TIMP por modificações nos níveis de DNA metiltransferases (DNMTs), enzima responsável por metilar uma citosina em citosina-fosfato-guanosina (CpG) e provocar, dessa maneira, um silenciamento da expressão gênica (RASOOL et al., 2015).

Em especial, a diminuição da atividade da DNMT1, por conseguinte a redução da hipermetilação do DNA, permite o restabelecimento do equilíbrio da atividade entre as metaloproteinases e seus inibidores (TIMP) na diminuição da fibrose renovascular, nos casos de doenças renais crônicas (PUSHPAKUMAR et al., 2015).

A localização de liberação das MMP no espaço pericelular, bem como a sua associação a proteínas ou glicoproteínas celulares, também interferem na sua ativação e otimização da capacidade proteolítica e especificidade (GAFFNEY et al., 2015). Exemplos dessa relação podem ser demonstrados pela interação e ativação da MMP-1 após ligação ao domínio I das integrinas $\alpha 1$ e $\alpha 2$. Assim como, o aumento da invasividade tumoral quando a MMP-9 associa-se ao CD44 em um modelo experimental com murinos (STRICKER et al., 2001; YU; STAMENKOVIC, 2000).

A atividade das MMP é estreitamente regulada por inibidores endógenos em fluidos (α -macroglobulina e trombospondina-2) e os tecido específicos – inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP) e o RECK (MELDOLESI, 2015; NAVRATILOVA; KOLEK; PETREK, 2015).

A α -macroglobulina é um inibidor de amplo espectro que se concentra nos fluidos teciduais e sangue. Que ao ligar-se a MMP forma um complexo com os receptores *scavengers* na superfície celular, que posteriormente é endocitado e degradado intracelularmente (EGEBLAD; WERB, 2002).

A atuação da α -macroglobulina tem sido associada à atenuação da progressão da osteoartrite, pelo aumento de sua concentração no líquido sinovial e cartilagem afetados. A trombospondina-2 utiliza o mesmo mecanismo de inibição supracitado, mas atuando na inibição das MMP-2 e MMP-9 (LÖFFEK; SCHILLING; FRANZKE, 2011; WANG et al., 2014).

Os inibidores teciduais compreendem quatro membros, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4, com alta homologia estrutural e que atuam antagonicamente as MMP, ao formar uma ligação específica e quase sempre irreversível com essas proteases (EGEBLAD; WERB, 2002; LIZOTTE-WANIEWSKI; BREW; HENNEKENS, 2015). O aumento desses inibidores, ou, a superexpressão dos mesmos, têm sido associados a patologias de natureza inflamatória como a um fator protetor e/ou procrastinador da progressão da doença (NAVRATILOVA; KOLEK; PETREK, 2015).

A expressão desses inibidores nas enfermidades podem ser ilustrada na formação das placas ateroscleróticas com os níveis de expressão elevados de TIMP-1 e baixos níveis de TIMP-2 (DI GREGOLI et al., 2015). Assim como o TIMP-2, que se apresenta em baixos níveis em crianças que vieram a desenvolver displasia broncopulmonar, sugerindo uma associação inversamente proporcional entre expressão de inibidor e o risco da doença (LEE et al., 2015). O uso de inibidores na terapêutica tem sido incorporado na prática clínica, como o TIMP-3 que vem sendo utilizado no tratamento de doenças cardíacas, já que tem sido demonstrado como potente atenuador dos sintomas (LIZOTTE-WANIEWSKI; BREW; HENNEKENS, 2015). Paradoxalmente, as avaliações de TIMP e RECK em neoplasias têm demonstrado altos níveis de expressão na presença de tumores em estádios mais avançados. Os achados em câncer cervical evidenciam uma alta expressão de TIMP e RECK, atingindo seus menores níveis nas lesões invasivas e neoplasia intraepitelial cervical 3 (NIC-3). Em contraponto, as maiores expressões em NIC-I e cervicite (CARDEAL et al., 2012).

Corroborando com os achados previamente descritos, níveis aumentados de mRNA de TIMP-2 *in vitro* foram associados ao aumento da taxa de proliferação celular em tumores de pulmão. Podendo os TIMP futuramente funcionarem como eficientes biomarcadores do câncer, potenciais alvos terapêuticos e/ou adjuvantes quimioterápicos (VANDENBROUCKE; LIBERT, 2014; KIM et al., 2015a; RICCI; BRUZZESE; DI CARLO, 2015).

As atividades fisiológicas das MMP no remodelamento da MEC têm sido envolvidas em diferentes contextos fisiológicos, como na reprodução, embriogênese, angiogênese, reparo tecidual e interações com mecanismos imunes (STERNLICHT; WERB, 2001; LÖFFEK; SCHILLING; FRANZKE, 2011).

Vem sendo descrito que a clivagem de proteínas pelas endopeptidases permite não apenas a produção de fragmentos proteicos inertes, mas também a formação de peptídeos ativos com funções biológicas distintas das funções de seus precursores (PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007).

Como demonstrado na clivagem da laminina-5 pela MMP-2 ao influenciar a motilidade celular, ao expor ligantes envolvidos no movimento celular (GIANNELLI et al., 1997). As MMP-1, MMP-2 e MMP-3 foram associadas à clivagem e ativação *in vitro* do fator de crescimento semelhante à

insulina ligado a proteína 3 (IGFBP-3), que no núcleo age como modulador da transcrição gênica de outros fatores de crescimento e vitaminas (FOWLKES et al., 1995; BAXTER, 2015;).

Foi descrito que na embriogênese os níveis e ativação das MMP-2 e MMP-9 estão aumentados, fenômeno que facilita a implantação do trofoblasto na parede endometrial, em contrapartida aos níveis mais basais dos TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3, no mesmo evento (FLUHR et al., 2008).

Em pacientes com problemas de fertilidade e inflamação crônica endometrial, as taxas de sucesso na fecundação após tratamento eram baixas. No entanto, pacientes com as mesmas características clínicas, mas com níveis elevados de MMP-2 e MMP-9 no trato genital, apresentavam maior taxa de fecundação que o grupo anterior. Sugerindo, uma vez mais, o efeito facilitador desempenhado pelas MMP na implantação do trofoblasto na parede endometrial (YOSHII et al., 2013).

As ações classicamente conhecidas no reparo de lesões teciduais, hoje são suplementadas pelas ações de motilidade celular e potencial em estimular a angiogênese (LÖFFEK; SCHILLING; FRANZKE, 2011; VANDENBROUCKE; LIBERT, 2014). Como visto em um ensaio de invasão celular e recomposição da MB, onde os níveis de MMP-2 e MMP-9 associados à vimentina estiveram aumentados durante a invasão e baixos durante a recomposição do epitélio. Resultados semelhantes foram descritos no reparo de folhetos da válvula mitral, com aumentos de atividade das MMP-1, MMP-2, MMP-9 e MMP-13 na área de lesão e adjacências (LÖFFEK; SCHILLING; FRANZKE, 2011; BLEAKEN; MENKO; WALKER, 2015).

Além das funções previamente discutidas, as MMP estendem seu papel ao atuar como moduladores em processos imunes e patológicos de natureza inflamatória (LÖFFEK; SCHILLING; FRANZKE, 2011). Participam na regulação da transmigração celular dos vasos para os locais focais da inflamação. Somadas a atuação no recrutamento das células, na liberação de fatores quimiotáticos, como as citocinas, e na criação de espaços na MEC para a passagem de células inflamatórias. Além de agir no estímulo da superexpressão de fatores angiogênicos em processos inflamatórios (NISSINEN; KÄHÄRI, 2014; CHANG et al., 2015).

Um estudo relacionando a infecção fúngica por *Cryptococcus* e a ação das MMP-3 e MMP-12, descobriu-se como essas endopeptidases podem atuar na modulação da resposta imune. Níveis elevados de expressão CCL2, potente fator quimiotático para macrófagos e neutrófilos, foi associado a níveis concomitantes da MMP-12. Sugerindo a presença da MMP como importante agente potencializador do infiltrado celular e da resposta inflamatória (SUPASORN et al., 2015).

De forma mais ampla, diversas MMP podem ser descritas como participantes desses processos imunes. A MMP-7, por exemplo, está associada à opsonização de bactérias, a formação da fibrose pulmonar, enfisema e doença pulmonar obstrutiva (GIANNANDREA; PARKS, 2014; NAVRATILOVA; KOLEK; PETREK, 2015; PRIOR et al., 2015).

Em descritos de formação de novos vasos em lesões da córnea, a participação da MMP-14 vem sendo relacionada a superexpressão dos fatores angiogênicos VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) (CHANG et al., 2015). Já em casos de piora do quadro sintomatológico da artrite pela exacerbação da inflamação sinovial, a baixa expressão da MMP-8 vem sendo associada (GARCÍA et al., 2010).

Os papéis das MMPs no câncer começaram a ser discutidos a partir de achados experimentais em fases mais avançadas da doença, como agentes facilitadores da formação de metástases (COUSSENS; WERB, 1996). Mas a amplitude de conhecimentos disponíveis nos dias atuais sobre as MMP permite a real compreensão sobre a crítica desenvoltura dessas proteases na manutenção do microambiente tumoral, desde as fases mais iniciais de formação neoplásica (CATHCART; PULKOSKI-GROSS; CAO, 2015).

A expressão das metaloproteinases atualmente está associada à quase totalidade dos diferentes tipos de câncer, com o aumento da atividade intimamente correlacionado ao avanço dos estádios tumorais, a invasão tecidual, desenvolvimento de metástases e indicativo de pior prognóstico clínico (EGEBLAD; WERB, 2002).

Contudo, alguns trabalhos têm demonstrado o potencial efeito protetor de algumas MMP em determinados tipos neoplásicos. A expressão da MMP-12, por exemplo, vem sendo destacada como indicativo de bom prognóstico em

tumores de cólon, já que o decréscimo de VEGF, e por conseguinte, a formação de novos vasos que irrigariam o tumor (SAID; RAUFMAN; XIE, 2014; WILSON et al., 1997). A expressão de mRNA de MMP-7, por exemplo foi relatada apenas em tumores iniciais e benignos da linhagem de cólon em modelo experimental murino (DECOCK et al., 2011).

Esses achados são relevantes do ponto de vista clínico e com importante perspectiva de aplicabilidade terapêutica. Apesar disso, os trabalhos com esse escopo são realizados de forma mais espaçada e apresentam discordâncias nos achados *in vivo* e *in vitro* quanto ao real papel das MMP avaliadas na carcinogênese (DECOCK et al., 2011); necessitando dessa forma, de avaliações mais robustas e com maior diversidade de tipos neoplásicos estudados.

A despeito desses fatos, os maiores esforços das pesquisas feitas nos últimos anos tem buscado de fato, elucidar e sedimentar o conhecimento adquirido nas relações existentes entre as metaloproteínas e a carcinogênese. Já é sabido que diferentemente dos oncogenes clássicos, a regulação das MMP no câncer não é regida por amplificação gênica e ativação mutacional (EGEBLAD; WERB, 2002). A superexpressão está mais relacionada à regulação transcricional e pós-transcricionais por fatores de crescimento e citocinas (STERNLICHT; WERB, 2001).

Isso não significa que a presença de polimorfismos genéticos na região promotora das metaloproteinases não possa influenciar a transcrição a susceptibilidade a progressão tumoral, como demonstrado em tumores de mama, estômago e colo do útero (CHEN et al., 2011; KESH et al., 2015; MARAL et al., 2015).

Como mencionado anteriormente, o papel das MMP não está resumido a participações nos eventos de invasão e formação de metástases. Hoje é sabido que o envolvimento das MMP é mais complexo e fomenta a manutenção do microambiente tumoral de forma ampla (Figura 6), podendo ser elencado como atuações relevantes na carcinogênese: a participação na regulação de fatores de crescimento, na evasão da apoptose, promoção da angiogênese e do escape imune (EGEBLAD; WERB, 2002).

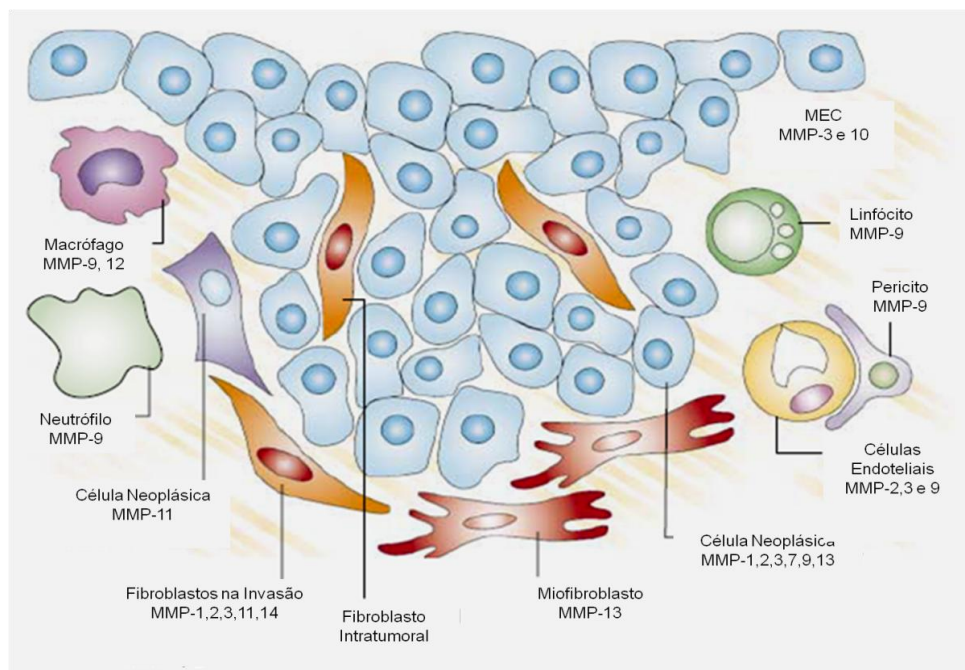


Figura 8. Representação dos componentes celulares envolvidos no microambiente tumoral e as respectivas MMP que liberam no meio extracelular. Adaptado de: EGEBLAD; WERB, 2002.

A ativação de MMP-13 em tumores mamários foi descrita como ativador da MMP-9, que por sua vez ativa o TGF- β , importante fator de crescimento celular e de invasão em tumores. Levando, nesse caso, ao estímulo da osteólise na metástase óssea (NANNURU et al., 2010).

O gene supressor de tumor p53 quando em condições normais, parece modular a expressão de algumas MMP, com o estímulo da expressão da MMP-1 e a regulação negativa da MMP-9. No entanto, em diversos tipos tumorais a p53 apresenta-se mutada ou deletada, suplantando dessa forma o mecanismo apoptótico de morte celular (MEYER et al., 2005).

Em um ensaio realizado com linhagem de neoplasia prostática com a deleção de p53, foi demonstrado o aumento da expressão e atividade das MMP-2, MMP-9 e MMP-14. Sendo nesse contexto, o escape apoptótico e aumento concomitante dos níveis de metaloproteinases envolvidos no aumento das chances de invasão e metástase (WANG et al., 2013).

O sistema imune é o principal articulador das interações células/tumores no microambiente tumoral. O sistema de vigilância detém a capacidade de reconhecimento das células neoplásicas. No entanto, o tumor faz uso de mecanismos moleculares que burlam a imunovigilância e que garantem a sua

permanência e desenvolvimento, a chamada imunotolerância (MOON et al., 2015).

A ativação de linfócitos T, importantes efetores da imunidade adquirida, é dependente de uma sinalização intermediada pela IL-2 com o fator transcricional STAT5 (HSIAO et al., 2014). Em um ensaio realizado *in vitro* foi proposto a participação das MMP-2 e MMP-9 na diminuição da expressão da IL-2, e por consequência, da ativação de linfócitos T e ação de mecanismos imunes (SHEU et al., 2001). Em outro estudo, desta vez com neoplasia pancreática, a MMP-9 esteve associada a baixa ativação das células efectoras da imunovigilância, as células NK (células *natural killers*) (PENG et al., 2014).

A viabilidade do tumor depende diretamente do aporte nutricional e de oxigênio fornecidos pelo microambiente onde está inserido. Esse feito só é alcançado pelo fenômeno da formação de novos vasos, estimulados em grande parte pelo recrutador endotelial VEGF (FU et al., 2015). A liberação desses fatores ocorre mediante estímulo das MMP, em especial da MMP-9 que é produzida largamente pelos polimorfonucleares, linfócitos, fibroblastos e células neoplásicas que estão presentes no tumor (VERMA et al., 2014). Um estudo *in vitro* demonstrou a coexpressão da MMP-9, do VEGF e TGF- β , sugerindo a ação conjunta dessas moléculas na formação de novos vasos em tumores odontológicos (ZHONG et al., 2015).

As maiores taxas de óbitos ocasionadas pelo câncer estão associadas diretamente às complicações surgidas pelo desenvolvimento de metástases. O processo até a sua formação compreende diversos passos. Sendo os mais limitantes, o desprendimento da célula da massa tumoral, por clivagem das moléculas de adesão celular, como a e-caderina e a clivagem proteolítica da membrana basal, com consequente invasão das células tumorais nos tecidos adjacentes (QUIGLEY, 2006; BONALDI et al., 2015; DERYUGINA; FU et al., 2015; GUAN, 2015).

As MMP-2 e MMP-9 são relacionadas diretamente a essas etapas já que degradam primordialmente o colágeno tipo IV, principal constituinte proteico da membrana basal (BJÖRKLUND; KOIVUNEN, 2005; RAHIMI; YARI; RAHIMI, 2015), como demonstrado em uma avaliação de pacientes pré e pós menopausadas com diferentes estádios de lesão do colo. Foi observado um aumento progressivo das taxas ativas das MMP-2 e MMP-9 de acordo com a

gravidade do grau histológico. Sendo os maiores níveis atingidos nos casos de carcinoma escamoso invasor (GHOSH et al., 2014).

2.6. Metaloproteinase 2 na Carcinogênese Cervical

A MMP-2 é uma collagenase tipo IV, com 72KD, também conhecida como gelatinase, localiza-se no cromossomo 16. O gene possui 17 kb de tamanho, com 13 éxons variando em tamanho de 110 a 901pb e 12 íntrons com variação de 175 a 4,350 pb (HUHTALA et al., 1990).

Desempenha importante papel na dissolução do colágeno tipo IV, maior componente estrutural da membrana basal (THEOCHARIS et al., 2015). Sua atuação como potencial facilitador do processo metastático vem sendo relacionada à progressão tumoral (XIE et al., 2015).

A participação da MMP-2 nos processos de progressão do tumor tem sido bem estabelecida em diversos tipos tumorais por meio de avaliações *in vivo* e *in vitro*. O aumento da capacidade de invasão (Figura 9) foi verificada em trabalhos realizados com câncer de próstata, glioma e em tumores de mama multi-drogas resistentes (JÚNIOR et al., 2015; SUN et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

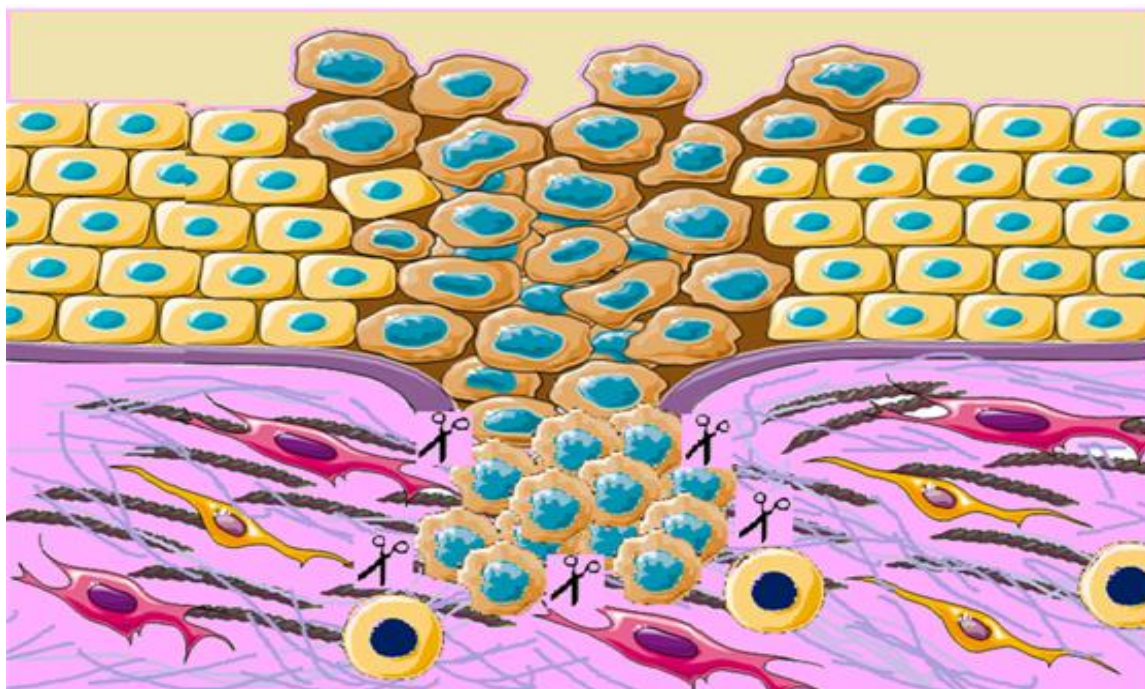


Figura 9. Representação da participação MMP-2 na progressão tumoral. O processo de progressão tumoral de um carcinoma escamoso *in situ* para o câncer invasivo, no câncer de colo do útero. A MMP-2 desempenha papel primordial na clivagem do

colágeno tipo IV da membrana basal, permitindo o início da formação metastática, ao liberar células da massa tumoral no tecido adjacente. Fonte: Autora.

A forte associação entre a atividade catalítica da MMP-2 na progressão do câncer tem conduzido os pesquisadores a investigarem os possíveis fatores condutores para esse achado. A avaliação de polimorfismos de base única (SNP) na região promotora do gene da MMP-2 no câncer tem iniciado um importante canal na busca pelo entendimento do comportamento tumoral, assim, de seu ambiente na carcinogênese e progressão de tumores (XIE et al., 2015).

As regiões mutantes mais estudadas em diferentes tumores são as localizadas na posição -1306 C/T e -735 C/T (KIM et al., 2015a; WU et al., 2015; YARI; RAHIMI; MORADI, 2013). Os resultados apresentados até agora são inconsistentes, no que refere a real associação entre a presença dos genótipos mutantes e o risco aumentado na progressão maligna (SINGH; JAIN; MITTAL, 2008; SRIVASTAVA et al., 2013; SINGH et al., 2015).

Do ponto de vista molecular, a presença do polimorfismo -1306 C/T confere um fator regulador negativo na transcrição. Já que o fator de transcrição Sp1 reconhece e liga-se a regiões CG do promotor gênico, favorecendo desta maneira, o início da transcrição (MA et al., 2004; QIN; SUN; BENVENISTE, 1999). No entanto, a troca de uma citosina para uma timina modifica essa conformação, diminuindo a afinidade de ligação do fator Sp1, e por consequência a transcrição da MMP-2 (TACHEVA et al., 2015).

Alguns estudos têm demonstrado a associação do polimorfismo na região -1306 C/T no gene da MMP-2 com o aumento do risco de desenvolvimento de câncer gástrico de cárdia, câncer esofágico, câncer ovariano, câncer de pulmão e nasofaringe (SHAO et al., 2011; GONZÁLEZ-ARRIAGA et al., 2012; COVEN et al., 2014; KIM et al., 2015b; NÉJIMA et al., 2015; ZHANG; XI; ZHANG, 2015).

Os trabalhos avaliando a contribuição do SNP na região -735 C/T são mais escassos, conflitantes e com resultados mais frágeis, no que diz respeito à caracterização do genótipo mutante como participante da progressão neoplásica para a malignidade. Como demonstrado nas avaliações feitas em câncer de mama, onde houve associação favorável ao desenvolvimento neoplásico. Enquanto que nos estudos com câncer do colo do útero e

menangiomas intracranianos não houve associação para a progressão e formação de metástases (SRIVASTAVA et al., 2013; YARI; RAHIMI; MORADI, 2013; COVEN et al., 2014).

Em relação ao risco de progressão tumoral, os resultados presentes na literatura demonstram-se inconsistentes para a presença dos polimorfismos das MMP-2 e o risco de metástase em outros tipos de neoplasia como: mama, cabeça e pescoço, melanoma, gástrico e colo-retal. Visto que fatores ambientais, genéticos e os diferentes mecanismos de regulação das MMP nos tumores podem influenciar, bem como, o número reduzido de amostras estudadas limitam os achados para a avaliação metastática (LIU et al., 2012).

No câncer de colo do útero, os achados são relativamente escassos e não apresentam uma concordância de resultados quanto à contribuição do polimorfismo do gene da MMP-2 para a influência de fenótipos neoplásicos, bem como do aumento do risco de invasão (BALTAZAR-RODRIGUEZ et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2013). Assim como, os mecanismos envolvidos na ação dos polimorfismos na região promotora do gene da MMP-2 na progressão da neoplasia do colo do útero ainda não são totalmente compreendidos (TURPEENNIEMI-HUJANEN, 2005).

Deste modo, este trabalho busca elucidar a possível associação e influência dos polimorfismos genéticos na MMP-2 na progressão das lesões cervicais. Bem como propor, a partir dos achados, novos alvos moleculares para futuras abordagens terapêuticas e prováveis biomarcadores diagnósticos e prognósticos para as lesões cervicais.

3.OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar em amostras de lesões cervicais pré-cancerosas a presença de polimorfismos de base única na região promotora do gene da metaloproteinase de matriz 2 (C-735T; C-1306T) em amostras cervicais de mulheres de Estados da região Nordeste.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a possível associação entre os polimorfismos encontrados com as características clínicas das pacientes incluídas no estudo;
- Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs da região promotoras dos genes da MMP-2 nas posições -735 (C/T) e -1306 (C/T);
- Comparar a variabilidade genética encontrada no gene da MMP-2 e das amostras estudadas com os achados descritos na literatura;
- Identificar e tipificar os Papilomavírus humano (HPV) presentes nas amostras cervicais e associar aos genótipos encontrados nas posições -735C/T e -1306C/T presentes na população de estudo.

4. MÉTODOS

4.1. Grupo de estudo

Foi realizado um estudo observacional analítico transversal com comparação de grupos. Foram incluídas no trabalho 215 amostras de escovado cervical de pacientes atendidas nos setores de Patologia Cervical do Hospital das Clínicas (HC/UFPE), oncologia ginecológica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) - Pernambuco e do Centro de Medicina Integrada de Sergipe (CEMISE) – Sergipe. A seleção de pacientes ocorreu de maneira aleatória.

Foram admitidas como pacientes caso aquelas que apresentavam atipia celular no exame citológico de Papanicolaou. As amostras cervicais foram então classificadas em lesão de baixo grau (LSIL) e lesão de alto grau (HSIL), obedecendo à nomenclatura sugerida pelo Sistema de Bethesda de 2001. Todas as amostras tiveram confirmação posterior da lesão com o laudo histopatológico. Como amostras controles foram incluídas pacientes com citologia normal e livre de infecção para o HPV.

Foram excluídas do presente trabalho mulheres HIV positivas, gestantes, portadoras de inflamação crônica e aquelas vacinadas profilaticamente para os HPV (6, 11, 16 e 18).

4.2. Aspectos Éticos

O presente trabalho apresenta aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) sob CAAE no 17068913.6.0000.5208 e no comitê de ética (HUOC/PROCAPE 64/2010), obedecendo integralmente aos princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Todas as amostras e demais informações das pacientes foram incluídas e avaliadas no estudo após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.3. Obtenção das Amostras

As amostras foram colhidas da cérvix uterina com o uso de uma escova ginecológica, que foram posteriormente acondicionadas em solução tampão fosfato-salino (PBS) em tubos Eppendorf® de 1,5ml. Posteriormente, foram encaminhadas ao laboratório e estocadas em freezer a -20 °C onde permaneceram até o posterior processamento.

4.4. Extração do DNA, Detecção e Tipificação do DNA Viral

O DNA das amostras foi previamente extraído utilizando-se o *GenomicPrep Blood DNA isolation kit (Amersham Bioscience)* de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram também submetidas à detecção de Papilomavírus humano através da técnica da PCR (*polymerase chain reaction – reação em cadeia da polimerase*) convencional, baseada na amplificação do gene codificador da L1 usando *primers* consenso e degenerados (MY09/MY11) (Tabela 1). Em seguida foram realizadas reações de amplificação para a tipificação de HPV utilizando *primers* específicos para os HPV 16, 18, 31 e 33 (Tabela 1). As amostras foram submetidas ao sequenciamento automático para confirmação da presença e do tipo de HPV pelo método dideoxi-terminal fluorescente, utilizando o kit *ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction* (Applied Biosystems®), através da colaboração com a plataforma multiusuária de sequenciamento e análise de expressão gênica do CCB-UFPE e FIOCRUZ – Aggeu Magalhaes, utilizando o sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystem®), de acordo com os padrões estabelecidos nesta unidade.

Tabela 1. Primers utilizados na detecção e tipificação do Papillomavírus humano. Adaptado de: (KARLSEN et al., 1996).

Tipo	Primer	Sequência do Primer (5' - 3')	Fragmento gerado (pb)
HPV	MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	445-499
HPV	MY11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	445-499
HPV 16	Pr1 Pr2	TCAAAAGCCACTGTGTCC TGA CGTGTTCTTGATGATCTGCAA	119
HPV 18	Pr1 Pr2	CCGAGCACGACAGGAACGACT TCGTTTTCTTCCTCTGAGTCGCTT	172
HPV 31	Pr1 Pr2	CCGAGCACGACAGGAACGACT TCGTTTTCTTCCTCTGAGTCGCTT	153
HPV 33	Pr1 Pr2	AACGCCATGAGAGGACACAAG ACACATAAACGAACTGTGGTG	211

4.5. Análise Genética

4.5.1. Análise Genética do Polimorfismo C-1306T da MMP-2

A genotipagem do polimorfismo C-1306T da MMP-2 foi realizada com o uso da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase por Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP), que consiste em uma amplificação do gene de análise seguida por uma digestão enzimática, a partir do produto amplificado.

Para a realização da PCR foram utilizados: 50 ng de DNA genômico, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, Thermo Scientific PCR Master Mix® [1X] e água para líquidos injetáveis.

A reação de amplificação foi realizada com o uso do termociclador Biocycler MG96+, sob as seguintes condições de ciclagem: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos para a desnaturação inicial do DNA genômico, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto para a amplificação do fragmento gênico de interesse e um único ciclo de 5 minutos por 72 °C, para a extensão final do fragmento.

O amplificado gênico obtido dessa reação foi submetido à digestão enzimática, com o uso da enzima de restrição Pvu II a 37 °C por 20 minutos. Na etapa seguinte, o produto digerido foi aplicado em gel de agarose na concentração de 3%, corado com brometo de etídio, para a avaliação do padrão das bandas formadas. Os tamanhos dos fragmentos gênicos gerados, bem como a sua correspondência genotípica estão ilustrados abaixo.

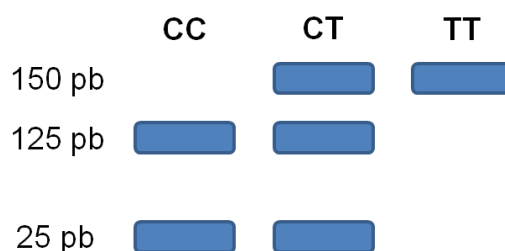


Figura 10. Representação esquemática do polimorfismo -1306 C/T, após a amplificação e digestão enzimática.

4.5.1. Análise Genética do Polimorfismo C-735T da MMP-2

A genotipagem do polimorfismo C-735T da MMP-2 foi realizada com o uso da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase uso da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase por Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP), que consiste em uma amplificação do gene de análise seguida por uma digestão enzimática, a partir do produto amplificado.

Para a realização da PCR foram utilizados: 50 ng de DNA genômico, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, Thermo Scientific PCR Master Mix® [1X] e água para líquidos injetáveis.

A reação de amplificação foi realizada com o uso do termociclador Biocycler MG96+, sob as seguintes condições de ciclagem: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos para a desnaturação inicial do DNA genômico, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 65 °C por 40 segundos, 72 °C por 30 segundos para a amplificação do fragmento gênico de interesse e um único ciclo de 5 minutos por 72 °C, para a extensão final do fragmento.

O amplificado gênico obtido dessa reação foi submetido à digestão enzimática, com o uso da enzima de restrição Hinf I a 37 °C por 20 minutos. Na etapa seguinte, o produto digerido foi aplicado em gel de agarose na concentração de 3%, corado com brometo de etídio, para a avaliação do

padrão das bandas formadas. Os tamanhos dos fragmentos gênicos gerados, bem como a sua correspondência genotípica estão ilustrados abaixo.

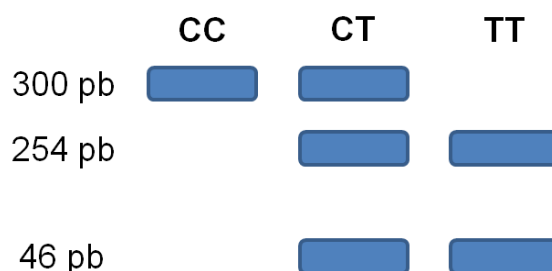


Figura 11. Representação esquemática do polimorfismo -1306 C/T, após a amplificação e digestão enzimática.

Tabela 2 - Relação dos oligonucleotídeos (*Primers*) utilizados para a avaliação dos polimorfismos gene da MMP-2.

Polimorfismo	Oligonucleotídeo	Autor
C-1306T	5'-CCCTGTGCCCCACCTTTTTCAGAT-3' 5'-AGCTGAGACCTGAAGAGCTAAACAGCT-3'	BALTAZAR-RODRIGUEZ et al., 2008
C-735T	5'-ATAGGGTAAACCTCCCCACATT-3' 5'-GGTAAAATGAGGCTGAGACCTG-3'	YARI; RAHIMI; MORADI, 2013

4.6. Análise Estatística

4.6.1. Análise dos Dados Sócio-Demográficos

As características sócio-demográficas das pacientes foram avaliadas quanto à associação através do teste de Fisher, com o uso do programa R versão 1.9-2.

4.6.2. Análise dos Polimorfismos

As frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos dos grupos caso e controle foram verificados se estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo teste exato de Fisher, com o uso do programa R versão 1.9-2.

A estimativa de risco relativo foi avaliada por meio do teste de Regressão Logística, com o intervalo de confiança de *odds ratio* de 95%, com dados adotados como significantes para valores de $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO POLIMORFISMO -1306 C/T NO PROMOTOR GÊNICO DA METALOPROTEINASE DE MATRIZ 2 EM LESÕES CERVICAIS DE MULHERES NA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL

Resumo

O câncer de colo uterino é uma das principais causas de neoplasia e morte em mulheres no mundo. Uma infecção prévia e persistente por genótipos de alto risco do Papillomavírus humano (HPV) está associada a quase a totalidade dos casos. A metaloproteinase 2 (MMP-2) é uma enzima proteolítica que é superexpressa nos casos de câncer cervical. A participação de polimorfismos presentes no gene da MMP-2, como o -1306C/T na região promotora, como fator de risco na progressão de lesões cervicais não está bem estabelecida. 52 casos de lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) e 67 lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL) de escovados cervicais foram avaliados acerca da presença do polimorfismo -1306C/T. 95 casos com citologia normal foram selecionados como grupo controle. A amplificação gênica e genotipagem foram feitas por PCR-RFLP, a digestão enzimática foi feita com o uso da enzima Pvu II. A MMP-2 C1306T esteve presente nos casos e controles sem diferença significativa entre os grupos LSIL e o controle ($p=0.17$; OR=0.37; 95 % CI=0.3-1.58). Assim como entre os grupos controle e HSIL ($p=0.71$ OR=0.08; 95 % CI=0.93-3.3). Também não foi encontrada associação significativa entre o uso de anticoncepcionais e a presença dos polimorfismos nos grupos LSIL ($p=0.37$ OR=0.65; 95 % CI=0.35-1.93) e HSIL ($p=0.65$; OR=0.08; 95 % CI=0.93-3.3). Da mesma maneira, que a associação entre a infecção pelo HPV e os genótipos polimórficos de análise não demonstraram associação significativa ($p>0,05$). No presente estudo não foi encontrada associação entre a presença do polimorfismo -1306C/T na região promotora da MMP-2 e o aumento do risco da progressão das lesões cervicais intraepiteliais.

INTRODUÇÃO

O câncer de colo do útero representa um problema de saúde pública a nível mundial, compreendendo a quarta maior causa neoplásica em mulheres, com cerca de 528.000 novos casos a cada ano (1). A sua etiologia está associada, em quase a sua totalidade, a uma infecção persistente pelos genótipos de alto risco do Papilomavírus humano (HPV), o que geralmente acontece nos primeiros anos do início da vida sexual (2,3).

Os países em desenvolvimento apresentam as maiores incidências e albergam cerca de 85% das notificações, superando as médias globais para este tipo neoplásico (4). No Brasil, apesar do singelo decréscimo ocorridos nos

últimos quatro anos, o câncer cervical representa a terceira causa de neoplasias entre mulheres (5,6).

Diversos estudos de associação têm demonstrado que a capacidade carcinogênica do HPV é plenamente atuante quando dispõe de meios consonantes de atuação, tais como, fatores de risco associados ao hospedeiro e a presença de cofatores do tipo: tabagismo, uso de anticoncepcionais orais, co-infecções com agentes infecciosos, imunocompetência e presença de polimorfismos genéticos (7–11).

Dentre esses cofatores se destaca a família de 24 enzimas proteolíticas zinco dependentes, as metaloproteinases de matriz (MMP). Várias dessas proteases estão envolvidas no processo de tumorigênese. Além disso, são as principais responsáveis pela digestão da matriz extracelular e membrana basal, bem como na formação de metástases (12,13). Entre essas ações destaca-se a atividade da MMP-2 (colagenase A), que depois de ativada atua primariamente na degradação do principal constituinte estrutural da membrana basal, o colágeno tipo IV (14), além de atuar na clivagem das moléculas de adesão célula-célula (como a e-caderina) e de fatores de crescimento ligados à insulina, modulando o escape dos mecanismos relacionados a apoptose celular (15,16).

A presença de polimorfismos na região promotora da MMP-2 pode afetar a transcrição gênica e a susceptibilidade à progressão tumoral. A presença do polimorfismo de base única na região -1306 C/T do promotor da MMP-2 interfere diretamente na capacidade transcrricional gênica ao modificar o sítio de ligação do fator transcrricional Sp1 (CCACC Box), e diminuir desta maneira, a atividade promotora com a presença do alelo T do gene da MMP-2 (17–19).

Trabalhos com câncer esofágico, nasofaríngeo, colo-retal e carcinoma gástrico associaram a presença desse polimorfismo a um aumento na susceptibilidade no desenvolvimento neoplásico (20–22). No entanto, alguns resultados demonstram-se discordantes ou inconclusivos quanto a real associação entre o polimorfismo e o desenvolvimento neoplásico, como os realizados com neoplasia mamária (23–25).

Por isso, no presente trabalho foi proposto a avaliação da possível associação entre a presença do polimorfismo de base única -1306 C/T com as lesões intraepiteliais do colo do útero.

MATERIAIS E MÉTODOS

Grupo de estudo

Foi realizado um estudo do tipo caso-controle com 119 casos de amostras de escovados cervicais de mulheres com faixa etária entre 16 e 82 anos, as quais apresentaram algum tipo de atipia celular no exame citológico de Papanicolaou. Foram encontrados 52 casos de lesão de baixo grau (LSIL) e 67 casos de lesão de alto grau (HSIL). Os espécimes foram obtidos dos setores de ginecologia dos Hospitais das Clínicas (HC/UFPE), Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) e do Centro de Medicina Integrada de Sergipe (CEMISE), Nordeste do Brasil. As avaliações citológicas obedeceram à classificação sugerida pelo Sistema de Bethesda, 2001 e todas tiveram a confirmação diagnóstica pela histopatologia. 96 casos com citologia normal e sem infecção para HPV foram incluídos como grupo controle.

Aspectos Éticos

O presente trabalho foi aprovado pelos respectivos comitês de ética das instituições acima descritas sob os números de inscrição CAAE no 17068913.6.0000.5208 (CEP/CCS/UFPE) e (HUOC/PROCAPE 64/2010).

Obtenção das Amostras

As amostras foram colhidas da cérvix uterina com o uso de uma escova ginecológica, que foram posteriormente acondicionadas em solução tampão fosfato-salino (PBS) em tubos Eppendorf® de 1,5ml. Posteriormente, foram encaminhadas ao laboratório e estocadas em freezer a -20°C, onde permaneceram até a etapa de extração do material genômico.

Extração do DNA, Detecção e Tipificação do DNA Viral

O DNA das amostras foi previamente extraído utilizando-se o *GenomicPrep Blood DNA isolation kit* (Amersham Bioscience) de acordo com

as instruções do fabricante. As amostras foram também submetidas à detecção de Papilomavírus humano através da técnica da PCR (*polymerase chain reaction* – *reação em cadeia da polimerase*) convencional, baseada na amplificação do gene codificador da L1 usando *primers* consenso e degenerados (MY09/MY11). Em seguida foram realizadas reações de amplificação para a tipificação de HPV utilizando *primers* específicos para os HPV 16, 18, 31 e 33 (tabela 1.1). As amostras foram submetidas ao sequenciamento automático para confirmação da presença do DNA do HPV pelo método dideoxi-terminal fluorescente, utilizando o kit ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems®), utilizando o sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystem®), de acordo com os padrões estabelecidos nesta unidade.

Análise Genética do Polimorfismo C-1306T da MMP-2

A genotipagem do polimorfismo C-1306T da MMP-2 foi realizado com o uso da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase por restrição de tamanho de fragmento polimórfico (PCR-RFLP) com o uso dos primers: F5'-CCCTGTGCCCCACCTTTTTCAGAT-3' e R5'-AGCTGAGACCTGAAGAGCTAAACAGCT-3'. Para a realização da PCR foram utilizados: 50 ng de DNA genômico, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, Thermo Scientific PCR Master Mix® [1X] e água para líquidos injetáveis. A reação de amplificação foi realizada com o uso do termociclador Biocycler MG96+, sob as seguintes condições de ciclagem: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos para a desnaturação inicial do DNA genômico, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto para a amplificação do fragmento gênico de interesse e um único ciclo de 5 minutos por 72 °C, para a extensão final do fragmento.

O amplificado gênico obtido dessa reação foi submetido à digestão enzimática, com o uso da enzima de restrição Pvu II a 37 °C por 20 minutos (15). Na etapa seguinte, o produto digerido foi aplicado em gel de agarose na concentração de 3%, corado com brometo de etídio, para a avaliação do padrão das bandas formadas. Todos os resultados dos genótipos foram analisados por segundo avaliador, a fim de se obter concordância dos achados finais.

Análise Estatística

Análise dos Dados Sócio-Demográficos

Os dados foram avaliados através do programa R versão 1.9-2. As características sócio-demográficas das pacientes foram avaliadas quanto à associação através do teste de Fisher. A distribuição da frequência alélica e genotípica dos polimorfismos entre os grupos casos e controle foram comparadas por meio do teste exato de Fisher. A estimativa do risco relativo foi avaliada pelo teste de Regressão Logística, com o intervalo de confiança de *odds ratio* de 95%, com dados adotados como significantes para valores de $p < 0.05$. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado para as distribuições alélicas e genotípicas.

Análise dos Polimorfismos

As frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos dos grupos caso e controle foram verificados se estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo teste exato de Fisher, com o uso do programa R versão 1.9-2. A estimativa do risco relativo foi avaliada pelo teste de Regressão Logística, com o intervalo de confiança de *odds ratio* de 95%, com dados adotados como significantes para valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Características Clínicas e Demográficas das Pacientes do Estudo

No presente estudo foram avaliados 119 casos de escovados cervicais com resultado de atipia celular no exame citológico, sendo 52 casos classificados como LSIL e 67 classificados como HSIL. Todos os casos positivos para lesão na citologia foram confirmados posteriormente pelo resultado histopatológico. 96 casos com resultado citológico normal e livre de infecção pelo HPV foram selecionados para compor o grupo controle.

A média etária das pacientes avaliadas foi de 32,1 anos ($\pm 9,94$) e 38,22 anos ($\pm 13,0$), para o LSIL e HSIL respectivamente, e 39,72 anos ($\pm 11,02$) para o grupo controle. 25,0% ($n=30$) das pacientes do grupo caso e 15,63% ($n=$) pacientes do grupo controle faziam uso de anticoncepcionais orais (tabela 2). A

população de análise apresentou distribuição genotípica consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para o polimorfismo estudado.

O uso de anticonceptivo e a associação com o polimorfismo -1306 C/T

Quando investigada a associação entre o uso de anticonceptivo oral com a presença do genótipo MMP-2 C1306T, foi observado que não houve associação estatística entre o cofator e a presença do polimorfismo ($p=0.37$; $OR=0.65$; $95\% CI=0.35-1.93$). O mesmo padrão de resposta estatística foi observada para a avaliação feita com os genótipos encontrado em HSIL e o uso do anticoncepcional ($p=0.65$; $OR=0.08$; $95\% CI=0.93-3.3$). Dessa forma, não sendo possível associar o uso de anticoncepcional ao aumento do risco de progressão da lesão na presença do polimorfismo em MMP2 (tabela 3).

Avaliação do cofator tabaco e a presença do -1306 C/T nas lesões cervicais

A frequência de pacientes tabagistas dentro do grupo caso avaliado foi de 9,24% ($n=11$). A análise do uso do tabaco está associada à presença do polimorfismo nas lesões cervicais foi feita, mas a associação não apresentou significância estatística ($p=0.19$; $OR=2.38$; $95\% CI=0.67-8.41$). A avaliação dos casos de LSIL e HSIL com os genótipos CC e CT também foram feitas, mas a associação nas amostras de estudo também não apresentou significância estatística, tanto para as lesões de baixo grau ($p=0.77$; $OR=1.44$; $95\% CI=0.13-15.55$), quanto para as pacientes com lesões de alto grau ($p=0.19$; $OR=2.88$; $95\% CI=0.59-14.15$) (tabela 4).

Prevalência da Infecção pelo HPV nas lesões cervicais

A detecção do genoma viral foi realizada por meio do uso de um par de *primer* degenerado direcionado à amplificação do gene L1, como descrito anteriormente na metodologia. Na avaliação dos HPV presentes nas amostras, foram identificados os tipos virais 6,11,16, 18, 31, 33, 53, 58, 61 e 81 descritos como mais prevalentes na região Nordeste do Brasil (26).

Das amostras caso avaliadas, 75,83% ($n=91$) foram positivas para o HPV, sendo 75,0% ($n=39$) dos casos de LSIL positivos e 76,12% ($n=51$) dos casos HSIL. 20,83% ($n=25$) dos casos foram positivos para tipos de HPV

diferentes daqueles avaliados pelos *primers* específicos e 24,17% dos casos foram negativos para a detecção viral. Os tipos virais mais incidentes para o LSIL e HSIL estão demonstrados na tabela 5.

Cerca de 69,23% (n=27) dos casos de LSIL apresentaram infecção única para HPV e 30,77% (n=12) apresentaram infecção múltipla para o HPV na mesma amostra. Nas amostras avaliadas para HSIL 74,51% (n=38) dos casos apresentaram infecção viral única e 23,53% (n=12) foram positivos para múltiplos HPV (gráficos 1 e 2).

Distribuição do Polimorfismo -1306 C/T nas amostras caso e controle

A frequência alélica observada em LSIL foi de 90,0% (n=94) para o alelo C e 10,0% (n=10) para o alelo T. Para HSIL a distribuição do alelo C também foi mais representativa com 70,0% (n=28) seguida por 30,0% (n=12) do alelo T.

A distribuição dos genótipos CC e CT foram de 81,1% (43/52) e 18,9% (10/52), respectivamente nos casos de LSIL e não apresentou diferença estatística significativa, quando comparada a mesma distribuição do grupo controle ($p=0.17$; OR=0.37; 95 % CI=0.3-1.58). O mesmo foi observado na avaliação para os casos de HSIL, com distribuição genotípica de 65,7% (44/67) para CC e 34,3% (23/67) para CT, não havendo diferença significativa em comparação ao grupo controle ($p=0.71$; OR=0.08; 95% CI=0.93-3.3) (tabela 6). Na avaliação dos dois grupos caso e controle, não foi encontrado o genótipo homozigoto mutante (TT).

O polimorfismo -1306 C/T e a infecção pelo Papilomavírus humano

A frequência genotípica de CC e CT do polimorfismo C1306T foi avaliada em amostras com lesões cervicais como positivas e negativas para a infecção para o HPV. Nas amostras positivas para a infecção viral, o genótipo CC esteve presente em 70,8% (n=63) e CT em 29,2% (n=26). A distribuição nas amostras negativas para o DNA viral também apresentou distribuição semelhante à dos casos positivos, com CC em 76,7% (n=23) e CT 23,3% (n=7), não sendo encontrada diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0.53$; OR=1.36; 95% CI=0.52-3.55).

A avaliação da distribuição genotípica do -1306 C/T por tipo de lesão e a infecção pelo HPV também foram realizadas, mas a associação estatística não

foi encontrada em ambos os grupos de lesão. A frequência para os casos de LSIL positivos para a detecção molecular viral foi de 79,5% (n=31) para CC e CT 20,5% (n=8). Enquanto que para o mesmo grupo de lesão e negativo para HPV a distribuição foi de 84,6% (n=11) para o genótipo CC e de 15,4% (n=2) dos casos para CT. Para as amostras avaliadas com citologia para HSIL e infecção viral, a frequência de CC foi de 64% (n=32) casos e de 36% (n=18) para o genótipo CT. Para as amostras de lesão de alto grau negativas para a infecção do HPV o genótipo CC esteve em 70,6% (n=12) e 29,4% (n=5) dos genótipos CT. No entanto, a associação não foi demonstrada estatisticamente em ambas as avaliações por lesão, tanto para as avaliações de LSIL ($p=0.68$; OR=1.42; 95%; CI=0.26-7.73), quanto para as avaliações para HSIL ($p=0.62$; OR=1.35; 95%; CI=0.41-4.45) (tabela 7).

A avaliação entre a associação da frequência genotípica do grupo caso também foi avaliada para a infecção pelo HPV 16, tipo viral mais frequente nas amostras avaliadas. O estudo de associação do C1306T entre as lesões cervicais e a infecção pelo HPV 16, foi feita inicialmente com o grupo caso reunido (LSIL e HSIL), a frequência genotípica para CC foi de 70,3% (n=26) e de 29,7% (n=11) dos casos positivos para o tipo 16. No entanto, a associação não foi demonstrada como estatisticamente significativa ($p=0.40$; OR=1.62; 95%; CI=0.52-5.08).

Análises similares foram feitas para os casos HPV 16 positivos com LSIL e HSIL isoladamente. Para as lesões de baixo grau, a frequência do genótipo CC foi de 84,6% (n=11) e 15,4% (n=2) para CT. A associação não foi demonstrada ser estatisticamente significativa entre infecção pelo tipo viral 16 e a distribuição do C1306T nas lesões de baixo grau ($p=1.00$; OR=1.00; 95%; CI=0.12-8.42). O mesmo perfil de resposta estatística foi obtida quando avaliados os casos de lesões de alto grau positivos para a infecção pelo HPV 16, a frequência de CC foi de 62,5% (n=15) e de 37,5% (n=9) para CT ($p=0.40$; OR=1.80; 95%; CI=0.44-7.31) (tabela 8).

DISCUSSÃO

O câncer de colo do útero representa a quarta maior causa de câncer em mulheres em todo o mundo(1). No Brasil, apesar da existência de um

programa de prevenção de lesões cervicais a nível nacional, o câncer cervical permanece entre os mais incidentes em mulheres ao longo dos anos(6). O principal fator de risco para a carcinogênese cervical é uma infecção prévia por um tipo de Papillomavírus humano de alto risco (3,27). No entanto, a atuação de cofatores em conjunto com os mecanismos virais de fato possibilitam a transformação celular maligna (8,28,29).

A família das MMP compreendem enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação de componentes da MEC, e que nos tumores estão envolvidas na invasão tumoral e na formação de metástases (7,16,30,31). A MMP-2 (gelatinase A) particularmente está associada à clivagem do colágeno tipo IV, principal componente da membrana basal, e posterior invasão das células tumorais aos tecidos adjacentes (32,33). A expressão proteica da MMP-2 vem sendo relatada em altos níveis nos casos de câncer (34,35). A presença de SNP na região promotora desse gene pode resultar em alterações nos mecanismos regulatórios transcricionais e pós transcricionais e influenciar, consequentemente, os níveis de expressão da MMP-2 nas neoplasias, facilitando a sua evolução maligna (36–40).

Neste estudo foi avaliado a possível associação do polimorfismo MMP-2 C1306T nas lesões intraepiteliais do colo do útero. Os achados encontrados no presente trabalho não evidenciaram qualquer tipo de associação entre a presença do polimorfismo e aumento do risco de evolução das lesões cervicais, ou, como fator protetor na possível evolução das mesmas. Também não foi encontrado diferença na frequência do polimorfismo entre os grupos caso avaliados e o grupo controle comparativo.

Resultados com o mesmo perfil foram encontrados em estudos realizados com câncer de mama e próstata em populações brasileiras(41,42) . Nesses trabalhos não foi demonstrada associação entre os genótipos CC, CT ou TT com o aumento do risco, ou, como fator protetor nessas neoplasias (41,42). O número restrito de amostras utilizadas pode ter contribuído para essa resposta nesses achados, assim como o perfil de resultado encontrado na presente análise. Achados semelhantes aos previamente descritos também foram encontrados na metanálise de Liu et al, 2012, onde o aumento do risco

de metástases não foi evidenciado em populações europeias e asiáticas em tumores gástricos, de mama, melanoma e câncer de cabeça e pescoço (43).

A presença do polimorfismo na MMP-2 C1306T vem sendo descrita como fator de risco para o desenvolvimento neoplásico e invasão teciduais em presença do genótipo CC em tumores de mama, colo do útero, nasofaríngeos e gástricos (15,23,25,44). Fato esse, que pode ser explicado pela funcionalidade da região promotora do gene da MMP-2 em ancorar genes supressores e fatores de transcrição, como o Sp1, em sua região CCACC box, região onde o polimorfismo acontece. A presença do genótipo CC favorece portanto, a ligação do Sp1 ao promotor do gene e transcrição da proteinase (17,18,20).

Enquanto a participação do genótipo CC parece estar bem estabelecida na facilitação para a invasão e formação de metástases, o genótipo TT apresenta resultados controversos na literatura quanto a sua funcionalidade na progressão dos tumores. A expressão de níveis mais baixos da MMP-2 quando na presença do polimorfismo C $\rightarrow$ T sugere que o alelo T provoca uma disrupção na ligação do fator Sp1 com o promotor, e assim afeta o potencial de transcrição do gene (17,33,45). No entanto, alguns trabalhos têm associado o genótipo TT ao risco de progressão neoplásica em tumores de colo do útero, pulmão e colorectal (33,46,47).

Assim como descrito nos achados de Yaykasli *et al*, 2014 e Ohtani *et al*, 2009 nas neoplasias de próstata e coloretal, nenhum genótipo TT foi encontrado no presente estudo, tanto no grupo controle, quanto nos grupos caso avaliados (36,48,49). Fato que pode ser atribuído ao reduzido número da amostragem avaliada.

A literatura tem demonstrado a relevância do uso prolongado de anticoncepcionais orais como cofator do desenvolvimento de tumores ginecológicos (50,51). No entanto, no presente trabalho o uso desse cofator não demonstrou nenhuma associação com a presença dos polimorfismos nas lesões cervicais. Talvez uma avaliação incluindo um maior número de casos possa demonstrar uma provável associação do cofator com a presença do polimorfismo e aumento do risco de progressão neoplásica.

O tabagismo tem sido descrito em diferentes trabalhos como importante cofator no processo de carcinogênese em diferentes neoplasias (52–54). No

presente trabalho o uso do tabaco e a sua possível interação com os genótipos de C1306T nas lesões cervicais não foram encontrados. Esse perfil de resposta encontra-se dentro do mesmo representado pelos resultados descritos por Butkiewicz et al, 2015, em tumores de pulmão inoperáveis e por Sharma et al, 2012, em vesícula biliar, avaliando-se o mesmo polimorfismo nesses tumores (46,55). Uma avaliação da mesma natureza, mas com um escopo amostral mais robusto, talvez possa evidenciar resultados mais significativos e ajudar a elucidar as possíveis interações do tabaco com o -1306C/T em lesões cervicais.

Uma infecção prévia e persistente por um genótipo viral de alto risco do HPV está relacionado a aproximadamente 99% dos casos ao surgimento da neoplasia cervical (56,57). No entanto, no presente achado as taxas de detecção viral estiveram positivas em apenas pouco mais de 75% dos casos, o que pode ter sido ocasionado por uma limitação na sensibilidade da metodologia utilizada para a detecção do DNA viral.

A infecção pelo Papillomavírus humano também tem sido relacionada a alterações da atividade das MMP em modelos *in vitro* (58). Como demonstrado no trabalho de Cardeal et al 2012, os níveis de expressão das MMP-2 e MMP-9, em especial, apresentaram-se elevados em linhagens de carcinoma cervical em presença dos oncogenes virais do HPV 16 (59,60). Sugerindo a participação viral como interferente nos aumentos dos níveis de expressão das metaloproteinases no carcinoma cervical. Adicionalmente, a associação viral à presença do polimorfismo em metaloproteinase-2 vem sendo investigada, contudo até o momento, a participação do HPV na progressão tumoral em presença de C1306T não foi demonstrada (40). O mesmo pôde ser observado no presente resultado para as avaliações da associação da infecção viral e os genótipos de -1306C/T. Situação que pode ser justificada pela restrição amostral e/ou pela ausência de uma avaliação da expressão proteica nos casos de infecção viral.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho não demonstraram quaisquer associações significativas entre a presença do polimorfismo e o aumento do risco de evolução das lesões. Da mesma maneira que a presença da infecção

pelo HPV, o uso de anticoncepcivo oral e o tabagismo parecem não influenciar os riscos de progressão das lesões em presença do -1306 C/T. Portanto, mais estudos devem ser realizados utilizando um número amostral maior a fim de elucidar a possível influência do MMP-2 C1306T nas lesões pré neoplásicas do colo do útero.

Tabela 1- Primers utilizados para a detecção e genotipagem do HPV. Adaptado de: Karlsen *et al*, 1996. (61).

Tipo	Primer	Sequência do Primer (5'- 3')	Fragmento gerado (pb)
HPV	MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	445-499
HPV	MY11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	445-499
HPV 16	Pr1 Pr2	TCAAAAGCCACTGTGTCC TGA CGTGTTCTTGATGATCTGCAA	119
HPV 18	Pr1 Pr2	CCGAGCACGACAGGAACGACT TCGTTTTCTTCCTCTGAGTCGCTT	172
HPV 31	Pr1 Pr2	CCGAGCACGACAGGAACGACT TCGTTTTCTTCCTCTGAGTCGCTT	153
HPV 33	Pr1 Pr2	AACGCCATGAGAGGACACAAG ACACATAAACGAACGTGGTG	211

Tabela 2- Características gerais das pacientes caso (LSIL e HSIL) e controle.

Características	LSIL (%) N= 52	HSIL (%) N= 67	Controle (%) N= 96
Média Idade (anos) (DP*)	32,1 (±9,94)	38,22 (±13,0)	39,72 (±11,02)
Uso Anticoncepcional			
<i>Sim</i>	18 (34,62%)	12 (17,91%)	15 (15,63%)
<i>Não</i>	34 (65,38%)	56 (83,58%)	81 (84,38%)
DP* Desvio Padrão			

Tabela 3- Polimorfismo de MMP-2 (SNP -1306) em pacientes com lesões de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL) e pacientes saudáveis com o uso de anticoncepcivo oral como cofator.

Casos^a	Controle^b	p-value; OR
--------------------------	-----------------------------	--------------------

	[95% CI]				
	LSIL ^c	HSIL ^d	Citologia Normal	LSIL vs. Anticoncepcional	HSIL vs. Anticoncepcional
-1306					
Genótipos					
CC	43 (81.1)	44 (65.7)	71 (74.7)	Referência	Referência
CT	10 (18.9)	23 (34.3)	24 (25.3)	0.65; 0.82 [0.35-1.93]	0.08; 1.75 [0.93-3.3]

Tabela 4- Polimorfismo da MMP-2 C1306T em pacientes com lesões cervicais de baixo (LSIL) e alto grau (HSIL) com o uso do tabaco como cofator.

	LSIL e HSIL Casos ^a	LSIL e HSIL Controle ^b	p-value; OR [95% C.I.]
	Tabagistas ^c	Não Tabagistas	Tabagistas vs. Não Tabagistas
-1306			
Genótipos			
CC	6 (54,5)	80 (74,1)	Referência
CT	5 (45,5)	28 (25,9)	1.00; 2,38 [0,67-8,41]
	LSIL Casos ^a	LSIL Controle ^b	p-value; OR [95% C.I.]
	Tabagistas ^c	Não Tabagistas	Tabagistas vs. Não Tabagistas
-1306			
Genótipos			
CC	3 (75)	39 (81,2)	Referência
CT	1 (25)	9 (18,8)	0.77; 1,44 [0,13-15,55]
	HSIL Casos ^a	HSIL Controle ^b	p-value; OR [95% C.I.]
	Tabagistas	Não Tabagistas	Tabagistas vs. Não Tabagistas
-1306			
Genótipos			
CC	3 (42,9)	41 (68,3)	Referência
CT	4 (57,1)	19 (31,7)	0.19; 2,88 [0,59-14,15]

Tabela 5- Distribuição da incidência viral nas lesões cervicais nas amostras avaliadas.

	HPV 16	HPV 31	HPV 33	HPV 58	HPV 70
LSIL	41,03% (16)	35,90% (14)	5,13% (2)	5,13% (2)	2,56% (1)
HSIL	58,82% (30)	27,45% (14)	5,88% (3)	5,88% (3)	1,97% (1)

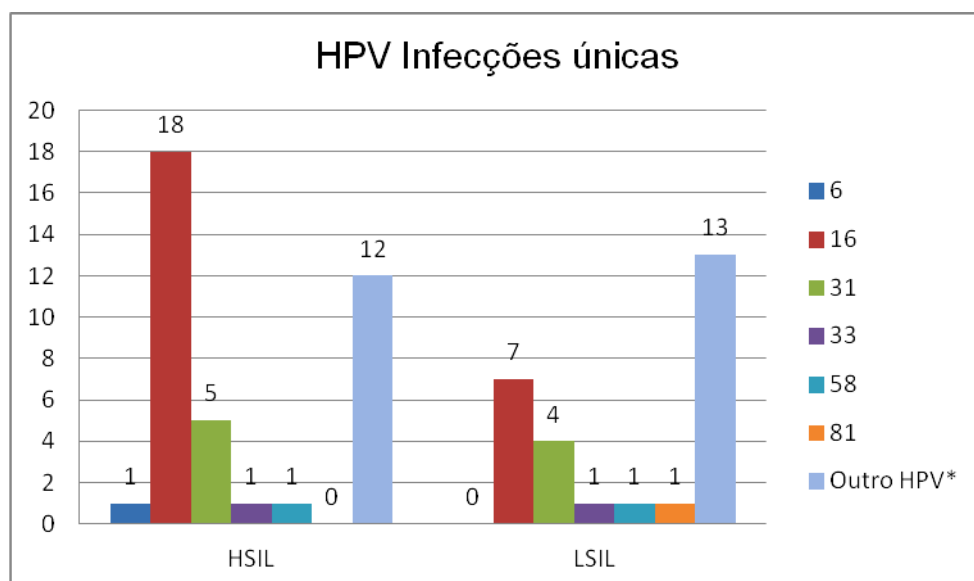


Gráfico 1. Distribuição em valores absolutos dos perfis dos HPV encontrados nas lesões cervicais com infecções únicas. Outro HPV*- Outros tipos virais que não foram identificados pelos *primers* específicos.

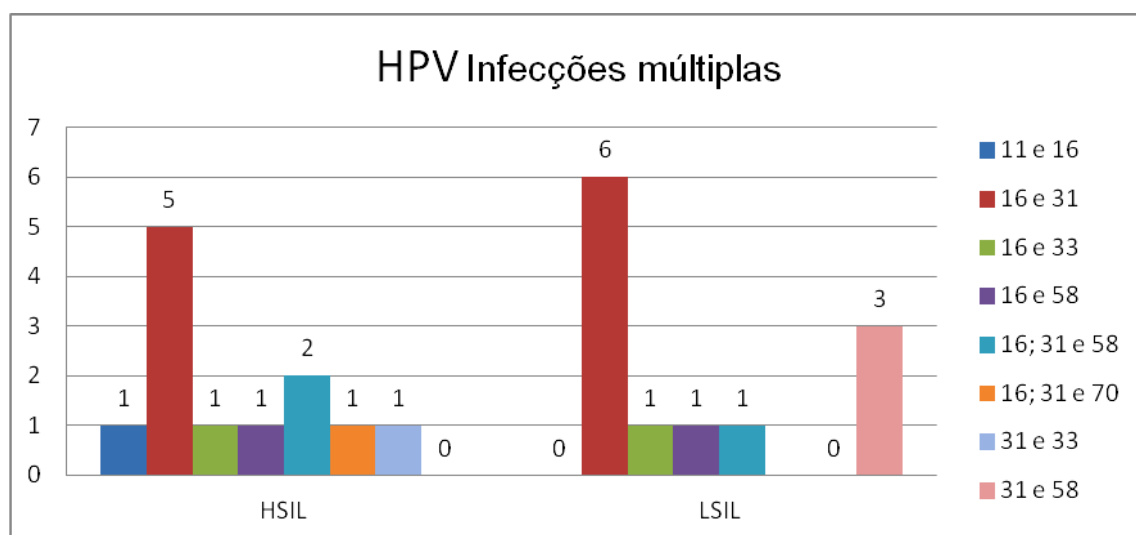


Gráfico 2. Distribuição em valores absolutos dos perfis dos HPV encontrados nas lesões cervicais com infecções virais múltiplas.

Tabela 6- Polimorfismo de MMP-2 (SNP -1306) em pacientes com lesões cervicais de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL) e pacientes saudáveis (grupo controle).

	Casos ^a		Controle ^b	<i>p-value; OR</i> [95% C.I.]	
	LSIL ^c	HSIL ^d	Citologia Normal	LSIL vs. Controle	HSIL vs. Controle
-1306					
Genótipos					
CC	43 (81.1)	44 (65.7)	71 (74.7)	Referência	Referência
CT	10 (18.9)	23 (34.3)	24 (25.3)	0.37; 0.69 [0.3-1.58]	0.08; 1.75 [0.93-3.3]

Tabela 7- Polimorfismo -1306C/T em lesões cervicais de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL) e a infecção pelo HPV.

	LSIL e HSIL Casos ^a	LSIL e HSIL Controle ^b	<i>p-value; OR</i> [95% C.I.]
	HPV Positivos ^c	HPV Negativos	HPV Positivos vs. HPV Negativos
-1306			
Genótipos			
CC	63 (70,8)	23 (76,7)	Referência
CT	26 (29,2)	7 (23,3)	0.53; 1,36 [0,52-3,55]
	LSIL Casos ^a	LSIL Controle ^b	<i>p-value; OR</i> [95% C.I.]
	HPV Positivos ^c	HPV Negativos	HPV Positivos vs. HPV Negativos
-1306			
Genótipos			
CC	31 (79,5)	11 (84,6)	Referência
CT	8 (20,5)	2 (15,4)	0.68; 1,42 [0,26-7,73]
	HSIL Casos ^a	HSIL Controle ^b	<i>p-value; OR</i> [95% C.I.]
	HPV Positivos ^c	HPV Negativos	HPV Positivos vs. HPV Negativos
-1306			
Genótipos			
CC	32 (64)	12 (70,6)	Referência
CT	18 (36)	5(29,4)	0.62; 1,35 [0,41-4,45]

Tabela 8- Polimorfismo -1306C/T em lesões cervicais de baixo (LSIL) e alto grau (HSIL) e a infecção pelo HPV 16.

	LSIL e HSIL Casos^a	LSIL e HSIL Controle^b	<i>p</i>-value; OR [95% C.I.]
	HPV 16 Positivos^c	HPV 16 Negativos	HPV 16 Positivos vs. HPV 16 Negativos
-1306			
Genótipos			
CC	26 (70,3)	23 (79,3)	Referência
CT	11 (29,7)	6 (20,7)	0.40;1,62 [0,52-5,08]
	LSIL Casos^a	LSIL Controle^b	<i>p</i>-value; OR [95% C.I.]
	HPV 16 Positivos^c	HPV 16 Negativos	HPV 16 Positivos vs. HPV 16 Negativos
-1306			
Genótipos			
CC	11 (84,6)	11 (84,6)	Referência
CT	2 (15,4)	2 (15,4)	1.00; 1,00 [0,12-8,42]
	HSIL Casos^a	HSIL Controle^b	<i>p</i>-value; OR [95% C.I.]
	HPV 16 Positivos^c	HPV 16 Negativos	HPV 16 Positivos vs. HPV 16 Negativos
-1306			
Genótipos			
CC	15 (62,5)	12 (75)	Referência
CT	9 (37,5)	4 (25)	0.40; 1,80 [0,44-7,31]

REFERÊNCIAS

1. WHO. Comprehensive Cervical Cancer Control: A Guide to Essential Practice [Internet]. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2014 [cited 2015 Dec 19]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK269619/>
2. Da Silva DM, Movius CA, Raff AB, Brand HE, Skeate JG, Wong MK, et al. Suppression of langerhans cell activation is conserved amongst human papillomavirus α and β genotypes, but not a μ genotype. *Virology*. 2014;452:279–86.
3. zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology*. 1991;184(1):9–13.
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359–86.
5. INCA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014. [Internet]. 2011 [cited 2015 Dec 19]. Available from: https://www.google.com.br/?gfe_rd=cr&ei=mWZ1VuSHMoaq8wfztopA&gws_rd=ssl#q=estimativa+inca+2014.pdf
6. INCA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014. [Internet]. 2014 [cited 2015 Dec 19]. Available from: https://www.google.com.br/?gfe_rd=cr&ei=mWZ1VuSHMoaq8wfztopA&gws_rd=ssl#q=estimativa+inca+2014.pdf
7. Cao S, Gan Y, Dong X, Lu Z. Herpes simplex virus type 2 and the risk of cervical cancer: a meta-analysis of observational studies. *Arch Gynecol Obstet*. 2014;290(6):1059–66.
8. Castellsagué X, Muñoz N, others. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;31:20–8.
9. Kumar MM, Davuluri S, Poojar S, Mukherjee G, Bajpai AK, Bafna UD, et al. Role of estrogen receptor alpha in human cervical cancer-associated fibroblasts: a transcriptomic study. *Tumor Biol*. 2015;1–12.
10. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *The Lancet*. 2002;359(9312):1085–92.

11. Zidi S, Sghaier I, Gazouani E, Mezlini A, Yacoubi-Loueslati B. Evaluation of Toll-Like Receptors 2/3/4/9 Gene Polymorphisms in Cervical Cancer Evolution. *Pathol Oncol Res.* 2015;1–8.
12. Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(31):5287–97.
13. Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and-9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie.* 2005;87(3):287–97.
14. Haque S, Akhter N, Lohani M, Ali A, Mandal RK. Matrix metalloproteinase-2 -1306 C>T gene polymorphism is associated with reduced risk of cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 2015;16(3):889–96.
15. Baltazar-Rodriguez LM, Anaya-Ventura A, Andrade-Soto M, Monrroy-Guizar EA, Bautista-Lam JR, Jonguitud-Olguin G, et al. Polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter is associated with cervical neoplasm risk in Mexican women. *Biochem Genet.* 2008;46(3-4):137–44.
16. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(3):161–74.
17. Price SJ, Greaves DR, Watkins H. Identification of Novel, Functional Genetic Variants in the Human Matrix Metalloproteinase-2 Gene ROLE OF Sp1 IN ALLELE-SPECIFIC TRANSCRIPTIONAL REGULATION. *J Biol Chem.* 2001;276(10):7549–58.
18. Qin H, Sun Y, Benveniste EN. The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *J Biol Chem.* 1999;274(41):29130–7.
19. Zhang F, Wang Z, Fan Y, Xu Q, Ji W, Tian R, et al. Elevated STAT3 Signaling-Mediated Upregulation of MMP-2/9 Confers Enhanced Invasion Ability in Multidrug-Resistant Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2015;16(10):24772–90.
20. Langers AMJ, Sier CFM, Hawinkels L, Kubben F, van Duijn W, van der Reijden JJ, et al. MMP-2 geno-phenotype is prognostic for colorectal cancer survival, whereas MMP-9 is not. *Br J Cancer.* 2008;98(11):1820–3.
21. Miao X, Yu C, Tan W, Xiong P, Liang G, Lu W, et al. A functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter (- 1306C/T) is associated with risk of development but not metastasis of gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2003;63(14):3987–90.
22. Shao J-Y, Cao Y, Miao X-P, Huang M-Y, Deng L, Hao J-J, et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase 2 promoter is closely associated with high risk of nasopharyngeal carcinoma in Cantonese from southern China. *Chin J Cancer.* 2011;30(9):620–6.

23. Beeghly-Fadiel A, Lu W, Long J-R, Shu X, Zheng Y, Cai Q, et al. Matrix metalloproteinase-2 polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(6):1770–6.
24. Delgado-Enciso I, Cepeda-Lopez FR, Monrroy-Guizar EA, Bautista-Lam JR, Andrade-Soto M, Jonguitud-Olguin G, et al. Matrix metalloproteinase-2 promoter polymorphism is associated with breast cancer in a Mexican population. *Gynecol Obstet Invest.* 2008;65(1):68–72.
25. Néjima DB, Zarkouna YB, Gammoudi A, Manai M, Boussen H. Prognostic impact of polymorphism of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase tissue inhibitor-2 promoters in breast cancer in Tunisia: case-control study. *Tumor Biol.* 2015;36(5):3815–22.
26. Chagas BS, Comar M, Gurgel APAD, Paiva S, Seraceni S, de Freitas AC, et al. Association Study between Cervical Lesions and Single or Multiple Vaccine-Target and Non-Vaccine Target Human Papillomavirus (HPV) Types in Women from Northeastern Brazil. *PloS One.* 2015;10(7):e0132570.
27. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(8):550–60.
28. Chagas BS, Gurgel APAD, da Cruz HLA, Amaral CMM, Cardoso MV, Neto J da CS, et al. An interleukin-10 gene polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human Papillomavirus and using oral contraceptives. *Infect Genet Evol.* 2013;19:32–7.
29. de Freitas AC, Gurgel APAD, Chagas BS, Coimbra EC, do Amaral CMM. Susceptibility to cervical cancer: an overview. *Gynecol Oncol.* 2012;126(2):304–11.
30. Cathcart J, Pulkoski-Gross A, Cao J. Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideas. *Genes Dis.* 2015;2(1):26–34.
31. Coussens LM, Werb Z. Matrix metal loproteinases and the development of cancer. *Chem Biol.* 1996;3(11):895–904.
32. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev [Internet].* 2015 [cited 2015 Dec 28]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X15002574>
33. Xie B, Zhang Z, Wang H, Chen Z, Wang Y, Liang H, et al. Genetic polymorphisms in MMP 2, 3, 7, and 9 genes and the susceptibility and clinical outcome of cervical cancer in a Chinese Han population. *Tumor Biol.* 2015;1–6.
34. Sun W, Qiu G, Zou Y, Cai Z, Wang P, Lin X, et al. Knockdown of TMEM45A inhibits the proliferation, migration and invasion of glioma cells. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(10):12657–67.
35. Júnior S, Matheus WE, Garcia PV, Stopiglia RM, Billis A, Ferreira U, et al. Characterization of reactive stroma in prostate cancer: involvement of growth

factors, metalloproteinase matrix, sexual hormones receptors and prostatic stem cells. *Int Braz J Urol.* 2015;41(5):849–58.

36. Kim YR, Jeon YJ, Kim HS, Kim JO, Moon MJ, Ahn EH, et al. Association study of five functional polymorphisms in matrix metalloproteinase-2,-3, and-9 genes with risk of primary ovarian insufficiency in Korean women. *Maturitas.* 2015;80(2):192–7.

37. Wu Z, Jiang P, Zulqarnain H, Gao H, Zhang W. Relationship between single-nucleotide polymorphism of matrix metalloproteinase-2 gene and colorectal cancer and gastric cancer susceptibility: a meta-analysis. *OncoTargets Ther.* 2015;8:861–9.

38. Srivastava P, Pandey S, Mittal B, Mittal RD. No association of matrix metalloproteinase [MMP]-2 (- 735C> T) and tissue inhibitor of metalloproteinase [TIMP]-2 (- 418G> C) gene polymorphisms with cervical cancer susceptibility. *Indian J Clin Biochem.* 2013;28(1):13–8.

39. Singh H, Jain M, Mittal B. MMP-7 (- 181A> G) promoter polymorphisms and risk for cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008;110(1):71–5.

40. Singh N, Hussain S, Sharma U, Suri V, Nijhawan R, Bharadwaj M, et al. The protective role of the- 1306C> T functional polymorphism in matrix metalloproteinase-2 gene is associated with cervical cancer: implication of human papillomavirus infection. *Tumor Biol.* 2015;1–9.

41. dos Reis ST, Pontes J, Villanova FE, de Andrade Borra PM, Antunes AA, Dall'oglio MF, et al. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases: susceptibility and prognostic implications for prostate cancer. *J Urol.* 2009;181(5):2320–5.

42. Roehe AV, Frazzon APG, Agnes G, Damin AP, Hartman AA, Graudenz MS. Detection of polymorphisms in the promoters of matrix metalloproteinases 2 and 9 genes in breast cancer in South Brazil: preliminary results. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;102(1):123–4.

43. Liu D, Guo H, Li Y, Xu X, Yang K, Bai Y. Association between polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases (MMPs) and risk of cancer metastasis: a meta-analysis. *PloS One.* 2012;7(2):e31251.

44. Yang J, Li L, Yin X, Wu F, Shen J, Peng Y, et al. The association between gene polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma. *Med Oncol.* 2015;32(1):1–8.

45. Xu E, Lai M, Lv B, Xing X, Huang Q, Xia X. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter is associated with colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;324(3):999–1003.

46. Butkiewicz D, Krzeńskiak M, Drosik A, Giglok M, Gdowicz-Kłłosok A, Kosarewicz A, et al. The VEGFR2, COX-2 and MMP-2 polymorphisms are associated with clinical outcome of patients with inoperable non-small cell lung

cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2015 [cited 2015 Dec 19]; Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.29605/abstract>

47. Shalaby MA, Nounou HA, Ms A, Azzam N, Saeed HM, others. Associations between Single Nucleotide Polymorphisms of COX-2 and MMP-2 Genes and Colorectal Cancer Susceptibility in the Saudi Population. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2013;15(12):4989–94.

48. YAYKAŞLI KO, Kayikci MA, Yamak N, SOĞUKTAŞ H, DÜZENLİ S, Arslan AO, et al. Polymorphisms in MMP-2 and TIMP-2 in Turkish patients with prostate cancer. *Turk J Med Sci*. 2014;44(5):839–43.

49. Ohtani H, Maeda N, Murawaki Y, others. Functional polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinase-2,-3,-7,-9 and TNF-alpha genes, and the risk of colorectal neoplasm in Japanese. *Yonago Acta Med*. 2009;52(1):47–56.

50. Green LS MI Urban. Cancer Institute (WIA), Chennai, India: T Rajkumar Jane, others. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16 573 women with cervical cancer and 35 509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *The Lancet*. 2007;370(9599):1609–21.

51. Chagas BS, Gurgel APAD, da Cruz HLA, Amaral CMM, Cardoso MV, Neto J da CS, et al. An interleukin-10 gene polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human Papillomavirus and using oral contraceptives. *Infect Genet Evol*. 2013;19:32–7.

52. La Vecchia C. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP* [Internet]. 2016 [cited 2016 Jan 28]; Available from: <http://europepmc.org/abstract/med/26731563>

53. Kalavrezos N, Scully C. Mouth Cancer for Clinicians Part 4: Risk Factors (Traditional: Alcohol, Betel and Others). *Dent Update*. 2015;42(7):644–6.

54. Tanner NT, Kanodra NM, Gebregziabher M, Payne E, Hughes Halbert C, Warren GW, et al. The Association Between Smoking Abstinence and Mortality in the National Lung Screening Trial. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2015 [cited 2016 Jan 28];(ja). Available from: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.201507-1420OC>

55. Sharma KL, Misra S, Kumar A, Mittal B. Higher risk of matrix metalloproteinase (MMP-2, 7, 9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2) genetic variants to gallbladder cancer. *Liver Int*. 2012;32(8):1278–86.

56. Hong JH, Song SH, Kim JK, Han JH, Lee JK. Comparison of the novel human papillomavirus 4 auto-capillary electrophoresis test with the hybrid capture 2 assay and with the PCR HPV typing set test in the detection of high-risk HPV including HPV 16 and 18 genotypes in cervical specimens. *J Korean Med Sci*. 2009;24(4):579–84.

57. Awua AK, Sackey ST, Osei YD, Asmah RH, Wiredu EK. Prevalence of human papillomavirus genotypes among women with cervical cancer in Ghana. *Infect Agent Cancer*. 2016;11:4.
58. Cardeal LB da S, Brohem CA, Corrêa TCS, Winnischofer SMB, Nakano F, Boccardo E, et al. Higher expression and activity of metalloproteinases in human cervical carcinoma cell lines is associated with HPV presence. *Biochem Cell Biol*. 2006;84(5):713–9.
59. Cardeal LB da S, Boccardo E, Termini L, Rabachini T, Andreoli MA, Loreto C di, et al. HPV16 oncoproteins induce MMPs/RECK-TIMP-2 imbalance in primary keratinocytes: possible implications in cervical carcinogenesis. *PlosOne*. 2012;7(3):e33585.
60. Kaewprag J, Umnajvjit W, Ngamkham J, Ponglikitmongkol M. HPV16 oncoproteins promote cervical cancer invasiveness by upregulating specific matrix metalloproteinases. *PloS One*. 2013;8(8):e71611.
61. Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, Kristensen G, Holm R, et al. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clin Microbiol*. 1996;34(9):2095–100.

6. POLIMORFISMO NO PROMOTOR DA METALOPROTEINASE DE MATRIZ 2 (-735 C/T) COMO FATOR PROTETOR DA PROGRESSÃO DAS LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS EM MULHERES DO NORDESTE DO BRASIL

Resumo

A metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) desempenha papel importante na progressão de lesões cervicais e na formação de metástases no câncer de colo uterino. A presença de polimorfismos de base única parece ter influência no aumento do risco e piora prognóstica. No entanto, a possível associação do polimorfismo -735 C/T na região promotora do gene da MMP-2 em câncer cervical não está bem estabelecida. Para isso, foram avaliados 63 casos de lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) e 73 lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL). 91 casos com citologia normal foram selecionados como grupo controle. A amplificação gênica e genotipagem foram realizadas por PCR-RFLP, a digestão enzimática foi feita com o uso da enzima Hinf I. A frequência do polimorfismo não apresentou diferença significativa entre os grupos caso e controle. Não houve associação estatística entre o grupo LSIL e o controle ($p=0.79$; OR=0.94; 95% CI=0.56-2.15), bem como entre o grupo HSIL e o controle ($p=0.74$; OR=1.07; 95% CI=0.50-1.64). A presença do genótipo TT no modelo recessivo apresentou-se como fator protetor da progressão das lesões cervicais ($p=0.04$; OR=0.66; 95% CI=0.10-0.96). Não foi encontrada associação significativa entre o uso de anticoncepcionais orais como cofator em presença do polimorfismo -735C/T, tanto para o grupo LSIL ($p=0.58$; OR=0.9; 95% CI=0.60-2.54), quanto para o HSIL ($p=0.63$; OR=0.74; 95% CI=0.47-1.57). Além disso, a associação entre a infecção viral e os genótipos C735T não foi demonstrada nas amostras analisadas ($p>0,05$). No presente estudo a presença do genótipo TT apresentou relevância estatística como fator protetor da progressão das lesões cervicais para a malignidade.

INTRODUÇÃO

O câncer de colo do útero figura na quarta posição entre os tipos neoplásicos mais incidentes em mulheres a nível mundial, com cerca de 528.000 novos casos por ano (1). Apesar dos esforços feitos no âmbito da prevenção de lesões, com realização de exames citológicos, inspeção por ácido acético (VIA) e uso de vacina profilática contra o Papillomavírus humano (HPV), as proporções de morbi-mortalidade permanecem altas (2). Grande parte dessas taxas, cerca de 85%, concentram-se em países com economias emergentes, onde os esquemas de prevenção são mais frágeis ou inexistentes(3).

O surgimento das lesões cervicais e do câncer de colo está estreitamente ligado a uma infecção prévia e persistente por genótipos de alto risco do HPV (4). Estima-se que mais de 80% da população sexualmente ativa entre em contato com o vírus ao menos uma vez (5).

No entanto, apesar dos altos índices de infecção, apenas cerca de 4% a 8% irão desenvolver algum tipo de lesão cervical (2). E apenas uma pequena proporção, ligeiramente inferior, irá chegar ao diagnóstico de carcinoma escamoso (6).

Uma das explicações utilizadas para essa relação díspar entre infecção e casos de lesão, reside no fato de que a presença do HPV no trato genital não é causa suficiente para o desenvolvimento neoplásico (7,8). Diversos cofatores estão sabidamente relacionados à carcinogênese cervical. O uso de anticoncepcionais orais, tabagismo, etilismo, imunodeficiências, coinfeções, fatores genéticos como polimorfismos e modificações epigenéticas, garantem ao hospedeiro um aumento da susceptibilidade individual as manifestações dos mecanismos carcinogênicos virais (9–12). Importantes cofatores, como a família das metaloproteinases (MMP), vêm sendo associadas a eventos de promoção tumoral, como a formação de novos vasos, liberação de fatores de crescimento e citocinas e proteólise da matriz extracelular (MEC), facilitando a formação de metástases (13–16).

No câncer de colo, particularmente, a MMP-2 desempenha importante papel ao ter como substrato de degradação o principal componente da membrana basal, o colágeno tipo IV. A expressão dessa endopeptidase tem sido encontrada em altos níveis nos casos de carcinoma e na formação de metástases (17,18).

A presença de polimorfismos de base única (SNP) tem sido encontrados nas regiões promotoras do gene da metaloproteinase-2 e associados ao aumento do risco de progressão de lesão e formação de metástases em neoplasias do colo, de tumores gástricos, mama entre outros (19–23).

No entanto, a associação de fato, entre aumento do risco de progressão e presença de polimorfismo não está bem estabelecida no câncer de colo do útero. Desta maneira, o presente trabalho objetiva associar a presença do polimorfismo de base única na região promotora do gene da MMP-2 (-735 C/T) ao risco de progressão das lesões cervicais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Grupo de estudo

Foi realizado um estudo do tipo caso-controle com 136 casos de amostras de escovados cervicais de mulheres com faixa etária entre 16 e 82 anos, que apresentavam algum tipo de atipia celular no exame citológico de Papanicolaou. Foram encontrados 63 casos de lesão de baixo grau (LSIL) e 73 casos de lesão de alto grau (HSIL). Os espécimes foram obtidos dos setores de ginecologia dos Hospitais das Clínicas (HC/UFPE), Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) e do Centro de Medicina Integrada de Sergipe (CEMISE), Nordeste do Brasil. As avaliações citológicas obedeceram à classificação sugerida pelo Sistema de Bethesda, 2001 e todas tiveram a confirmação diagnóstica pela histopatologia. 91 casos com citologia normal e sem infecção para HPV foram incluídos como grupo controle.

Aspectos Éticos

O presente trabalho foi aprovado pelos respectivos comitês de ética das instituições acima descritas sob os números de inscrição CAAE no 17068913.6.0000.5208 (CEP/CCS/UFPE) e (HUOC/PROCAPE 64/2010).

Obtenção das Amostras

As amostras foram coletadas a partir da cérvix uterina com o uso de uma escova ginecológica, que foram posteriormente acondicionadas em solução tampão fosfato-salino (PBS) em tubos Eppendorf® de 1,5ml. Posteriormente, foram encaminhadas ao laboratório e estocadas em freezer a -20 °C, onde permaneceram até a etapa de extração do material genômico.

Extração do DNA, Detecção e Tipificação do DNA Viral

O DNA das amostras foi previamente extraído utilizando-se o *GenomicPrep Blood DNA isolation kit* (Amersham Bioscience) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram também submetidas à detecção de Papilomavírus humano através da técnica da PCR (*polymerase chain reaction – reação em cadeia da polimerase*) convencional, baseada na amplificação do gene codificador da L1 usando *primers* consenso e

degenerados (MY09/MY11). Em seguida foram realizadas reações de amplificação para a tipificação de HPV utilizando *primers* específicos para os HPV 16, 18, 31 e 33 (tabela 1). As amostras foram submetidas ao sequenciamento automático para confirmação da presença do DNA do HPV pelo método dideoxi-terminal fluorescente, utilizando o kit ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems®), utilizando o sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystem®), de acordo com os padrões estabelecidos nesta unidade.

Análise Genética do Polimorfismo C-735T da MMP-2

A genotipagem do polimorfismo C-735T da MMP-2 foi realizada com o uso da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase por restrição de tamanho de fragmento polimórfico (PCR-RFLP) com o uso dos *primers*: F5'-ATAGGGTAAACCTCCCCACATT-3' e R5'-GGTAAATGAGGCTGAGACCTG-3'. Para a realização da PCR foram utilizados: 50 ng de DNA genômico, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, Thermo Scientific PCR Master Mix® [1X] e água para líquidos injetáveis. A reação de amplificação foi realizada com o uso do termociclador Biocycler MG96+, sob as seguintes condições de ciclagem: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos para a desnaturação inicial do DNA genômico, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 65°C por 40 segundos, 72°C por 30 segundos para a amplificação do fragmento gênico de interesse e um único ciclo de 5 minutos por 72 °C, para a extensão final do fragmento.

O amplificado gênico obtido dessa reação foi submetido à digestão enzimática, com o uso da enzima de restrição Hinf I a 37 °C por 20 minutos (22). Na etapa seguinte, o produto digerido foi aplicado em gel de agarose na concentração de 3%, corado com brometo de etídio, para a avaliação do padrão das bandas formadas. Todos os resultados dos genótipos foram analisados por um segundo avaliador, a fim de se obter concordância dos achados finais.

Análise Estatística

Análise dos Dados Sócio-Demográficos

Os dados foram avaliados através do programa R versão 1.9-2. As características sócio-demográficas das pacientes foram avaliadas quanto à associação através do teste de Fisher.

Análise dos Polimorfismos

A distribuição da frequência alélica e genotípica dos polimorfismos entre os grupos casos e controle foram comparadas por meio do teste exato de Fisher. A estimativa do risco relativo foi avaliada pelo teste de Regressão Logística, com o intervalo de confiança de *odds ratio* de 95%, com dados adotados como significantes para valores de $p < 0.05$. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado para as distribuições alélicas e genotípicas.

RESULTADOS

Características Clínicas e Demográficas das Pacientes do Estudo

Foram avaliados no estudo 136 amostras de escovados cervicais que apresentaram atipia celular no exame citológico de Papanicolaou. Essas foram então classificadas como grupo caso para LSIL 63 amostras e 73 casos para HSIL. Todos os resultados da citologia foram confirmados posteriormente pela avaliação histopatológica. 84 casos de escovados cervicais, com citologia normal e livre de infecção por HPV foram incluídos como grupo controle.

A média de idade das pacientes avaliadas foi de 32,4 ($\pm 10,79$) anos para os casos de LSIL, 38,04 ($\pm 13,03$) para o grupo HSIL e 40,84 ($\pm 10,62$) para os controles. Em relação ao uso de anticoncepcionais orais, menos de um terço das pacientes disseram fazer uso nos grupos HSIL 16 casos (21,92%) e controle 13 casos (14,29%). Enquanto que pouco mais de 30,0%, 23 casos (36,51%), fazem uso de anticoncepcional oral no grupo caso LSIL (tabela 2). A população de análise apresentou distribuição genotípica consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para o polimorfismo estudado.

O uso de anticonceptivo e a associação com o polimorfismo -735 C/T

Quando investigada a possível associação entre o uso de anticonceptivo oral e a presença do genótipo MMP-2 C735T não houve associação estatística significativa entre a presença de lesões cervicais de baixo grau com polimorfismo e o cofator ($p=0.58$; $OR=0.57$; $95\% CI=0.60-2.54$). A mesma resposta estatística foi obtida para a avaliação do grupo polimórfico com lesão de alto grau e o uso de anticonceptivo hormonal ($p=0.6269$; $OR=0.62$; $95\% CI=0.47-1.57$) (tabela 3). Desta maneira, não sendo possível associar o aumento do risco de progressão de lesões cervicais em pacientes portadoras do polimorfismo ao uso de anticoncepcional.

Avaliação do cofator tabaco e a presença do polimorfismo -735 C/T nas lesões cervicais

A frequência do uso do tabaco foi efetiva em 11,03% ($n=15$) das pacientes com lesão cervical. A análise de associação entre o uso do tabaco e a presença do polimorfismo -735 C/T foi realizada, no entanto, não foi observada associação significativa em nenhum dos modelos de dominância descritos para os casos de HSIL (tabela 4).

Prevalência da Infecção pelo HPV nas lesões cervicais

A detecção viral foi realizada por um par de *primers* degenerados direcionados a amplificação do gene L1, conservado em diversos tipos de HPV. Na avaliação dos HPV presentes nas amostras, foram identificados os tipos virais 16, 18, 31, 33, 53, 58, 61 e 81.

De todas as 136 amostras caso avaliadas, 77,20% ($n=105$) foram positivas para o HPV. Dessas, 55,14% ($n=75$) amplificaram para pelo menos um *primer* HPV específico. Enquanto que para 22,06% ($n=30$) das amostras foi possível apenas detectar a presença de infecção viral, não sendo possível identificar o tipo viral presente na amostra. Quando avaliados por tipo de lesão, a presença do genoma viral foi identificada em 87,31% ($n=48$) dos casos de LSIL e em 78,08% ($n=57$) dos casos de HSIL. Os HPV mais incidentes encontrados nas amostras estão detalhados na tabela 5.

Cerca de 75,0% ($n=36$) amostras positivas para HPV apresentaram infecção única e 25,0 % ($n=12$) infecção viral múltipla no grupo LSIL. O grupo

HSIL apresentou valores semelhantes, com 64,91% (n=37) para infecção única e 35,09% (n=20) dos casos com múltiplas infecções (gráficos 1 e 2).

Distribuição do Polimorfismo -735 C/T nas amostras caso e controle

A frequência dos alelos C e T para os grupos LSIL e HSIL apresentaram distribuições semelhantes, com 75,0% (n=39) para o alelo C para LSIL e 76,0% (n=35) para HSIL. Para o alelo T a frequência nas lesões de baixo foi de 25,05 (n=13) e 24,0% (n=11) para as lesões de alto grau.

A distribuição dos genótipos CC, CT e TT foram de 43,0% (52/122), 53,0% (65/122) e 4,0% (5/122) para o grupo caso, respectivamente. A distribuição no grupo controle foi 43,0% (36/84) para o genótipo CC, 45,0% (38/84) para o CT e 12,0% (10) para o genótipo mutante TT. Não foi observada diferença significativa entre as frequências dos genótipos entre os grupos controle e caso ($p=0.79$; OR=0.79; 95% CI=0.56-2.15). Assim como também não foi observada diferença significativa entre as avaliações dos grupos caso LSIL e HSIL com os controles (tabela 6).

Os grupos caso e controle também foram avaliados pelos modelos de dominância de expressão, em nenhuma das apresentações possíveis de expressão genotípica apresentam significância estatística. Apenas a avaliação do modelo recessivo apresentou significância estatística como o genótipo TT como fator protetor de lesões cervicais, com $p < 0,04$ (tabela 7).

O polimorfismo -735 C/T e a infecção pelo Papilomavírus humano

A frequência dos genótipos do polimorfismo C735T foi avaliada nas amostras de lesões cervicais positivas e negativas para a detecção viral. A distribuição genotípica apresentou o perfil de distribuição de CC 41% (n=39), CT 55% (n=53) e TT 4% (n=4) em amostras com a presença viral detectada. Resultados semelhantes foram encontrados nas amostras com lesões cervicais negativas para o HPV quanto à positividade com 50% (n=13) para o genótipo CC, 46% (n=12) para CT e 4% (n=1) para TT. O teste de associação realizado entre a presença do polimorfismo em lesões HSIL e o status da infecção viral não apresentou associação estatística significativa para nenhum dos modelos de dominância avaliados.

Essas análises também foram realizadas para os casos de lesões cervicais e a infecção para o HPV 16, tipo viral mais prevalente nas amostras estudadas. A distribuição genotípica obtida foi de 41% (n=19) para CC, 52% (n=24) para CT e 7% (n=3) para TT, nos casos positivos para a infecção pelo tipo 16 do vírus. Uma distribuição similar foi encontrada nas amostras negativas para esse tipo viral, com resultados de 50% (n=13) para CC, 41% (n=12) para CT e 4% (n=1) para TT. Na análise estatística, não foi encontrada associação entre a presença de -735 C/T e a infecção viral pelo tipo 16 em todos os modelos de dominância estudados (tabela 8).

O estudo de associação também foi realizado com as amostras LSIL e HSIL com resultados para a infecção pelo HPV 16. A distribuição genotípica para as lesões de baixo grau positivas e negativas, respectivamente, para a infecção viral foram similares, com representatividade de CC 40/46%, 53/46% para CT e 7/8% para TT. O mesmo comportamento da distribuição dos genótipos pôde ser observado nas amostras de HSIL, com resultados para CC de 42/54%, 52/46% para CT e 6/0% para TT, considerando os casos positivos e negativos para o HPV 16 respectivamente. Nos resultados de associação realizados, não foram obtidos dados estatisticamente significativos entre ambos os grupos de lesão avaliados e o status da infecção pelo HPV 16 (tabelas 9 e 10).

DISCUSSÃO

O câncer de colo do útero desponta como um dos principais causas de câncer em mulheres ao redor do mundo (1). A etiopatogênese do câncer cervical está associada, em quase a totalidade dos casos, a uma infecção prévia e persistente por um HPV de alto risco (24–26). No entanto, para o desenvolvimento neoplásico a infecção viral isoladamente não é suficiente, sendo requerida a participação direta de cofatores como facilitadores da susceptibilidade do hospedeiro aos mecanismos virais oncogênicos (9,10,27,28).

A família das MMP desempenham importante função na facilitação da manutenção do microambiente tumoral, pela liberação de fatores de crescimento, formação de vasos, invasão tecidual e formação de metástases (13,29–31). A MMP-2 (gelatinase A) degrada o colágeno tipo IV presente em

maior quantidade na membrana basal, facilitando dessa maneira a invasão tecidual nos casos de câncer (17,18,32). A presença de polimorfismos na região promotora do gene da MMP-2 podem levar a perturbações nos mecanismos de controle transcricionais e pós-transcricionais dessa colagenase, facilitando dessa maneira o risco de invasão tecidual e formação de metástases pelas células tumorais (22,23,23,33,34).

O presente estudo buscou avaliar a possível associação existente entre a presença da MMP-2 C735T e o risco de evolução das lesões cervicais pré neoplásicas. Os resultados obtidos neste trabalho não evidenciaram qualquer associação entre as frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo com o aumento ou diminuição do risco de progressão das lesões de baixo e alto grau nos grupos caso em comparação ao grupo controle normal. A diferença na frequência do polimorfismo entre os grupos caso e controle de análise também não foi estatisticamente significativa. O número amostral mais restrito pode ter influenciado o perfil negativo dessas análises.

Esses resultados são semelhantes aos descritos por Cotignola et al 2007. e Srivastava et al. 2012, com melanoma, câncer de colo e de próstata, onde nenhum dos genótipos encontrados apresentou associação com o risco de progressão neoplásica (23,35,36). A funcionalidade da presença do -735 C/T em neoplasias apresenta resultado conflitante entre as descrições dos autores.

Nas avaliações feitas em tumores de mama, os achados são mais lineares em relação à participação dos genótipos CT e TT e o aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento neoplásico e a invasão tecidual (22,37,38). Resultado semelhante aos descritos por Sharma et al. (2014), em câncer de vesícula biliar e por Srivastava et al. (2012) em tumor de bexiga, onde o aumento da susceptibilidade de progressão tumoral foi observado nos genótipos que carregavam o alelo T no promotor da MMP-2 (39,40). A associação alélica também tem sido descrita com o aumento dos riscos para os pacientes que apresentam o alelo C em tumores de mama e com histórico familiar, assim como nas chances de ocorrência e formação de metástases em câncer de esôfago, como descrito por Yari et al. (2013) e Yu et al. (2004) (38,41).

O risco aumentado em presença do alelo C pode ser explicado pela composição de um trecho na região promotora do gene da metaloproteinase 2 que alberga diversos sítios de ligação para genes supressores e fatores de transcrição como o AP1, Sp1 e Sp3 (21,42,43). Quando na presença do -735C/T, há uma alteração na sequência consenso de reconhecimento (CCCTCC → CTCTCC), impedindo desta maneira a ligação do fator Sp1 o que impede a ligação do fator Sp1 a iniciar o estímulo transcricional e expressão da MMP-2 (41,44).

No presente estudo, associação estatística foi encontrada na avaliação do modelo recessivo (TT) como fator protetor do grupo caso (LSIL mais HSIL), com redução dos riscos de progressão tumoral e invasão tecidual em relação ao grupo controle. Esses resultados também são suportados pelos descritos na metanálise realizada por Peng et al 2010, onde uma menor susceptibilidade ao câncer foi associada a presença do genótipo TT em tumores de pulmão, esôfago e outros (33,45). No entanto, uma avaliação mais robusta deve ser realizada a fim de tentar elucidar a real funcionalidade do genótipo TT como fator protetor ou fator de risco a progressão tumoral (46).

A influência do uso prolongado de anticoncepcionais orais como cofator do desenvolvimento em neoplasias ginecológicas tem sido avaliado e corroborado por diversos autores (9,11,47,48). Nos resultados obtidos nesse estudo, no entanto, não foram encontradas quaisquer associações entre os alelos, ou, genótipos da MMP-2 C735T com o aumento do risco de progressão neoplásica para a malignidade. Uma avaliação incluindo um número amostral maior com maior representatividade de pacientes usuárias de anticoncepcionais hormonais ajudem no entendimento da associação desse cofator com o polimorfismo de estudo.

Um dos principais cofatores associados ao desenvolvimento neoplásico do câncer de colo do útero é o tabagismo (49,50). No presente trabalho, a avaliação do risco entre o fumo e os genótipos de C735T não encontrou associação significativa. O mesmo panorama pôde ser observado nos resultados de Srivastva et al 2013 em câncer cervical e por Butkiewicz et al, 2015 em tumores de pulmão (23,51).

Dados de Lin et al, 2004(33,45), sugerem que aproximadamente 99% dos casos de câncer de colo do útero possuem a presença do HPV de alto

risco como principal fator etiológico do desenvolvimento do carcinoma cervical . Na presente análise, no entanto, a detecção viral foi possível em apenas 75,83% das amostras avaliadas, situação que pode estar relacionada a uma limitação na sensibilidade da metodologia de detecção viral utilizada.

O envolvimento do HPV na carcinogênese cervical vai além das já sabidas alterações na maquinaria das células escamosas (52). O aprofundamento do conhecimento sobre as interações do tumor e o microambiente adjacente, tem possibilitado um maior entendimento sobre as ações do HPV nos diferentes tipos celulares presentes na matriz extracelular (53). A expressão das MMP em modelos *in vitro*, por exemplo, tem demonstrado associação com a presença dos oncogenes virais nas linhagens celulares de estudo(54). Com os resultados de Kaewprag et al 2013, foi observado que o aumento dos níveis de mRNA dos oncogenes E6 e E7 estavam promovendo a superexpressão dos níveis proteicos das MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP nas linhagens de carcinoma escamoso cervical (55). Nos dados descritos por Zhu et al 2015, uma avaliação adicional suprimindo a expressão dos oncogenes E6 e E7 do HPV 16 foram realizados a fim de confirmar a interferência do vírus na expressão proteica. Foi observado que a expressão foi significativamente menor sem a presença dos oncogenes do HPV 16 do que no grupo controle. A interação entre polimorfismos e a presença viral também tem sido investigadas, como no trabalho de Singh et al 2015, onde a associação entre a infecção viral e os genótipos C1306T da MMP-2 no câncer cervical não foi significativa(32). O mesmo pôde ser observado nos resultados do presente trabalho, a associação entre o -735C/T e a positividade viral não foi significativa. Situação que poderia ser mais bem elucidada com a realização de uma metodologia que avalie o nível de expressão proteico dos diferentes genótipos em presença ou ausência da infecção pelo Papillomavírus humano.

Conclusão

Em conclusão, os achados obtidos no presente trabalho demonstraram que o genótipo TT presente no polimorfismo MMP-2 C735T parece conferir um fator protetor às lesões cervicais pré neoplásicas para a progressão maligna. No entanto, a associação dos demais genótipos e alelos com o risco de progressão das lesões cervicais não foi significativa. Assim como, o uso de anticoncepcionais orais, o tabagismo e a infecção pelo HPV não demonstraram associação com a presença dos polimorfismos nos casos com lesão intraepitelial. Mais trabalhos compreendendo a avaliação de mais amostras com mais cofatores devem ser realizados a fim de buscar elucidar de forma mais profunda a funcionalidade do polimorfismo -735C/T no câncer cervical.

Tabela 1- Primers utilizados para a detecção e genotipagem do HPV. Adaptado de Karlsen *et al*, 1996. (56).

Tipo	Primer	Sequência do Primer (5' - 3')	Fragmento gerado (pb)
HPV	MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	445-499
HPV	MY11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	445-499
HPV 16	Pr1 Pr2	TCAAAAGCCACTGTGTCC TGA CGTGTTCCTTGATGATCTGCAA	119
HPV 18	Pr1 Pr2	CCGAGCACGACAGGAACGACT TCGTTTTCTTCCTCTGAGTCGCTT	172
HPV 31	Pr1 Pr2	CCGAGCACGACAGGAACGACT TCGTTTTCTTCCTCTGAGTCGCTT	153
HPV 33	Pr1 Pr2	AACGCCATGAGAGGACACAAG ACACATAAACGAACTGTGGTG	211

Tabela 2- Características gerais das pacientes caso (LSIL e HSIL) e controle.

Características	LSIL (%) N= 63	HSIL (%) N= 73	Controle (%) N= 91
Média Idade (anos) (DP*)	32,4 (±10,79)	38,04 (±13,03)	40,84 (±10,62)
Uso Anticoncepcional			
Sim	23 (36,51%)	16 (21,92%)	13 (14,29%)
Não	40 (63,49%)	57 (78,10%)	78 (85,71%)

DP* Desvio Padrão

Tabela 3- Polimorfismo de MMP-2 (SNP -1306) em pacientes com lesões de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL) e pacientes saudáveis com o uso de anticoncepcivo oral como cofator.

	Casos^a		Controle^b	p-value; OR [95% CI]	
	LSIL^c	HSIL^d	Citologia Normal	LSIL vs. Controle	HSIL vs. Controle
-735					
Genótipos					
CC	24 (40.7)	28 (44.4)	36 (42.9)	Referência	Referência
CT / TT	35 (59.3)	35 (55.6)	48 (57.1)	0.57;1.23 [0.60-2.54]	0.62; 0.86 [0.47-1.57]

Tabela 4- Polimorfismo da MMP-2 C735T em pacientes com lesões cervicais de alto grau (HSIL) com o uso do tabaco como cofator.

	HSIL Casos^a	HSIL Controle^b	p-value; OR [95% C.I.]
	Tabagistas^c	Não Tabagistas	Tabagistas vs. Não Tabagistas
Modelo			
<i>Codominante</i>			
CC	2 (25,0)	26 (47,3)	Referência
CT	5 (62,5)	27 (49,1)	0.37; 2.41 [0,43-13.53]
TT	1 (12,5)	2 (3,6)	0.37; 6.50 [0,40 106.72]
<i>Dominante</i>			
CC	2 (25,0)	26 (47,3)	Referência
CT- TT	6 (75,0)	29 (52,7)	0.22; 2.69 [0,50-14.51]
<i>Recessivo</i>			
CC- CT	7 (87,5)	53 (96,4)	Referência
TT	1 (12,5)	2 (3,6)	0.34; 3.79 [0,30-47.36]
<i>Sobredominante</i>			
CC- TT	3 (37,5)	28 (50,9)	Referência
CT	5 (62,5)	27 (49,1)	0.48;1.73 [0,38-7,95]

Tabela 5- Distribuição da incidência viral nas lesões cervicais nas amostras avaliadas.

	HPV 16	HPV 31	HPV 33	HPV 58	HPV 6,11 e 53	HPV 11,61 e 81
LSIL	54,14% (16)	46,43% (13)	7,14% (2)	3,57% (1)	-	3,57% (1)
HSIL	97,30% (36)	51,35% (19)	13,51%(5)	8,11% (3)	2,70% (1)	-

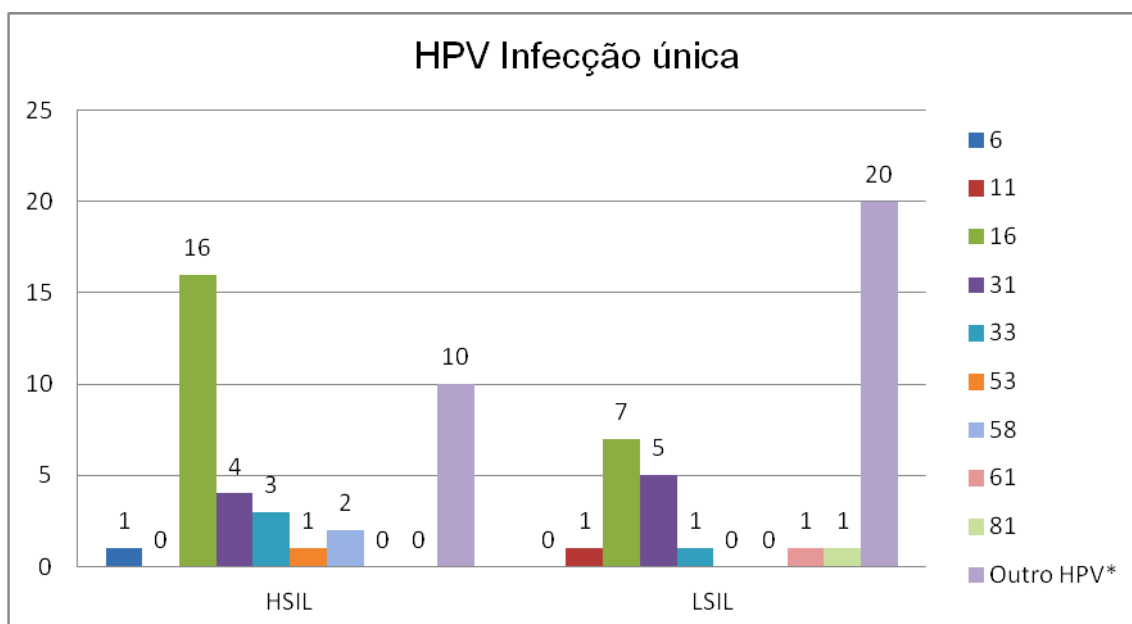


Gráfico 1. Distribuição em valores absolutos dos perfis dos HPV encontrados nas lesões cervicais com infecções únicas. Outro HPV*- Outros tipos virais que não foram identificados pelos *primers* específicos.

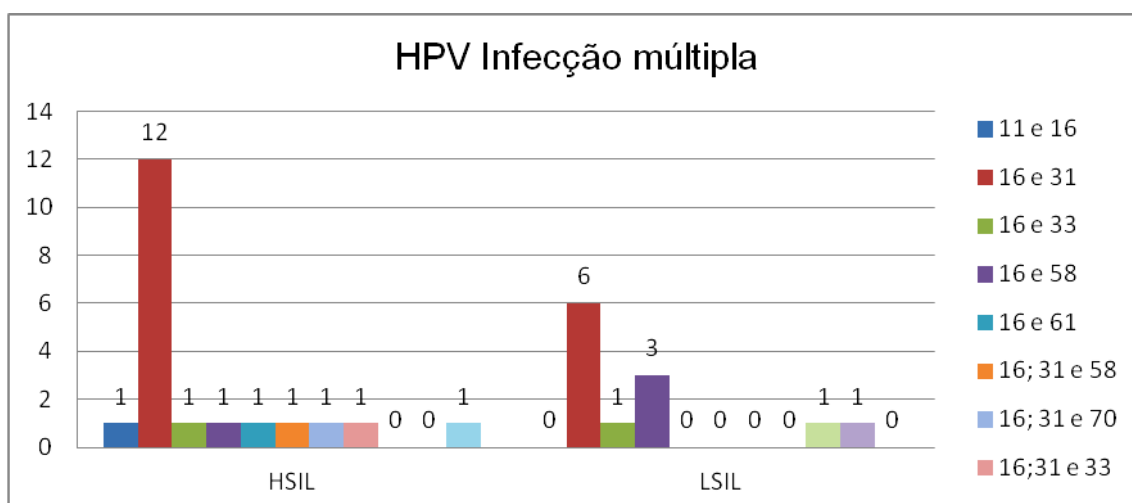


Gráfico 2. Distribuição em valores absolutos dos perfis dos HPV encontrados nas lesões cervicais com infecções virais múltiplas.

Tabela 6- Polimorfismo de MMP-2 (SNP -735) em pacientes com lesões de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL) e pacientes saudáveis (grupo controle).

	Casos ^a		Controles ^b	<i>p-value</i> ; OR [95% C.I.]	
	LSIL ^c	HSIL ^d	Citologia Normal	LSIL vs. Controle	HSIL vs. Controle
-735					
Genotypes					
CC	24 (40.7)	28 (44.1)	60 (42)	Reference	Reference
CT / TT	35 (59.3)	35 (55.6)	83 (58)	0.79; 1.09 [0.56-2.15]	0.73; 0.90 [0.50-1.64]

Tabela 7- Polimorfismo de MMP-2 (SNP -735) em pacientes com lesão intraepitelial e pacientes saudáveis.

Genótipos	Casos ^a		<i>p-value</i> ; OR [95% C.I.]
	Controles	Casos	Casos X Controles
Codominante			Referências
CC	36 (42,9)	52 (42,6)	
CT	38 (45,2)	65 (53,3)	
TT	10 (11,9)	5 (4,1)	0,35; 1,18 [0.11-2.12]
Dominante			
CC	36 (42,9)	52 (42,6)	
CT; TT	48 (57,1)	70 (57,4)	1,00; 1,01 [0,58-1,77]
Recessivo			
CC; CT	74 (88,1)	117(95,9)	
TT	10 (11,9)	5 (4,1)	0,03; 1,00 [0,10-0,96]
Codominante			
CC; TT	46 (54,8)	57 (46,7)	
CT	38 (45,2)	65 (53,3)	1,00;1,38 [0,79-2,41]

Tabela 8- Polimorfismo da MMP-2 C735T em pacientes com lesões cervicais de baixo (LSIL) e alto grau (HSIL) infecção pelo HPV 16.

	LSIL e HSIL Casos ^a	LSIL e HSIL Controle ^b	<i>p-value</i> ; OR [95% C.I.]
	HPV 16 Positivos ^c	HPV 16 Negativos	HPV 16 Positivos vs. HPV 16 Negativos
Modelo			
<i>Codominante</i>			
CC	19 (41,3)	13 (50,0)	Referência
CT	24 (52,2)	12 (46,1)	0,73;1,37 [0,51-3,68]
TT	3 (6,5)	1 (3,8)	0,73;2,05 [0,19-21,97]
<i>Dominante</i>			
CC	19 (41,3)	13 (50,0)	Referência
CT- TT	27 (58,7)	13 (50,0)	0,48;1,42 [0,54-3,74]
<i>Recessivo</i>			
CC- CT	43 (93,5)	25 (96,5)	Referência
TT	3 (6,5)	1 (3,8)	0,62;1,74 [0,17-17,68]
<i>Sobredominante</i>			
CC- TT	22 (47,8)	14(53,9)	Referência
CT	24 (52,2)	12 (46,1)	0,62;1,27 [0,49-3,34]

Tabela 9- Polimorfismo -735C/T em lesões cervicais de baixo grau (LSIL) e a infecção pelo HPV 16.

	LSIL Casos ^a	LSIL Controle ^b	<i>p-value</i> ; OR [95% C.I.]
	HPV 16 Positivos ^c	HPV 16 Negativos	HPV 16 Positivos vs. HPV 16 Negativos
Modelo			
<i>Codominante</i>			
CC	6 (40)	6 (46,1)	Referência
CT	8 (53,3)	6 (46,1)	0,93;1,33 [0,28-6,28]
TT	1 (6,7)	1 (7,7)	0,93; 1,00 [0,05-19,96]
<i>Dominante</i>			
CC	6 (40,0)	6 (46,1)	Referência
CT- TT	9 (60,0)	7 (53,9)	0,74;1,29 [0,29-5,77]
<i>Recessivo</i>			
CC- CT	14 (93,3)	12 (92,3)	Referência
TT	1 (6,7)	1 (7,7)	0,92;0,86 [0,05-15,23]
<i>Sobredominante</i>			
CC- TT	7 (46,7)	7(53,9)	Referência
CT	8 (53,3)	6 (46,1)	0,70;1,33 [0,30-5,91]

Tabela 10- Polimorfismo -735C/T em lesões cervicais de alto grau (HSIL) e a infecção pelo HPV 16.

	HSIL Casos ^a	HSIL Control ^b	<i>p-value</i> ; OR [95% C.I.]
	HPV 16 Positivos ^c	HPV 16 Negativos	HPV 16 Positivos vs. HPV 16 Negativos
Modelo			
<i>Codominante</i>			
CC	13 (41,9)	7 (53,9)	Referência
CT	16 (51,6)	6 (46,1)	0,42;1,44 [0,39-5,34]
TT	2 (6,5)	0 (0,0)	NA [0,00-NA]
<i>Dominante</i>			
CC	13 (41,9)	7 (53,9)	Referência
CT- TT	18 (58,1)	6 (46,1)	0,47;1,62 [0,44-5,95]
<i>Recessivo</i>			
CC- CT	29 (93,5)	13 (100,0)	Referência
TT	2 (6,5)	0 (0,0)	0,23; [0,00-NA]
<i>Sobredominante</i>			
CC- TT	15 (48,4)	7(53,9)	Referência
CT	16 (51,6)	6 (46,1)	0,74;1,24 [0,34-4,56]

REFERÊNCIAS

1. WHO. Comprehensive Cervical Cancer Control: A Guide to Essential Practice [Internet]. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2014 [cited 2015 Dec 19]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK269619/>
2. WHO. WHO Guidelines for Screening and Treatment of Precancerous Lesions for Cervical Cancer Prevention [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2013 [cited 2015 Dec 19]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK195239/>
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359–86.
4. zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology*. 1991;184(1):9–13.
5. Da Silva DM, Woodham AW, Rijkee LK, Skeate JG, Taylor JR, Koopman ME, et al. Human papillomavirus-exposed Langerhans cells are activated by stabilized Poly-I: C. *Papillomavirus Res*. 2015;1:12–21.
6. Učakar V, Poljak M, Oštrbenk A, Klavs I. Pre-vaccination prevalence of infections with 25 non-high-risk human papillomavirus types among 1,000 Slovenian women in cervical cancer screening. *J Med Virol*. 2014;86(10):1772–9.
7. Chagas BS, Comar M, Gurgel APAD, Paiva S, Seraceni S, de Freitas AC, et al. Association Study between Cervical Lesions and Single or Multiple Vaccine-Target and Non-Vaccine Target Human Papillomavirus (HPV) Types in Women from Northeastern Brazil. *PloS One*. 2015;10(7):e0132570.
8. de Freitas AC, Coimbra EC, Leitão M da CG. Molecular targets of HPV oncoproteins: potential biomarkers for cervical carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta BBA-Rev Cancer*. 2014;1845(2):91–103.
9. Castellsagué X, Muñoz N, others. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;31:20–8.
10. Matsumoto K, Yoshikawa H. Human papillomavirus infection and the risk of cervical cancer in Japan. *J Obstet Gynaecol Res*. 2013;39(1):7–17.
11. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *The Lancet*. 2002;359(9312):1085–92.
12. Zidi S, Sghaier I, Gazouani E, Mezlini A, Yacoubi-Loueslati B. Evaluation of Toll-Like Receptors 2/3/4/9 Gene Polymorphisms in Cervical Cancer Evolution. *Pathol Oncol Res*. 2015;1–8.

13. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):161–74.
14. Fu W-M, Lu Y-F, Hu B-G, Liang W-C, Zhu X, Yang H, et al. Long noncoding RNA hotair mediated angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma by direct and indirect signaling pathways. *Oncotarget*. 2015 Dec 22;
15. Verma S, Kesh K, Gupta A, Swarnakar S. An Overview of Matrix Metalloproteinase 9 Polymorphism and Gastric Cancer Risk. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2014;16(17):7393–400.
16. Zhong W-Q, Chen G, Zhang W, Xiong X-P, Zhao Y, Liu B, et al. M2-polarized macrophages in keratocystic odontogenic tumor: relation to tumor angiogenesis. *Sci Rep [Internet]*. 2015 [cited 2016 Jan 2];5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4623606/>
17. Sun W, Qiu G, Zou Y, Cai Z, Wang P, Lin X, et al. Knockdown of TMEM45A inhibits the proliferation, migration and invasion of glioma cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(10):12657–67.
18. Xie B, Zhang Z, Wang H, Chen Z, Wang Y, Liang H, et al. Genetic polymorphisms in MMP 2, 3, 7, and 9 genes and the susceptibility and clinical outcome of cervical cancer in a Chinese Han population. *Tumor Biol*. 2015;1–6.
19. Baltazar-Rodriguez LM, Anaya-Ventura A, Andrade-Soto M, Monrroy-Guizar EA, Bautista-Lam JR, Jonguitud-Olguin G, et al. Polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter is associated with cervical neoplasm risk in Mexican women. *Biochem Genet*. 2008;46(3-4):137–44.
20. Kim YR, Jeon YJ, Kim HS, Kim JO, Moon MJ, Ahn EH, et al. Association study of five functional polymorphisms in matrix metalloproteinase-2,-3, and-9 genes with risk of primary ovarian insufficiency in Korean women. *Maturitas*. 2015;80(2):192–7.
21. Miao X, Yu C, Tan W, Xiong P, Liang G, Lu W, et al. A functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter (- 1306C/T) is associated with risk of development but not metastasis of gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2003;63(14):3987–90.
22. Rahimi Z, Yari K, Rahimi Z. Matrix metalloproteinase-9 -1562T allele and its combination with MMP-2 -735 C allele are risk factors for breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2015;16(3):1175–9.
23. Srivastava P, Pandey S, Mittal B, Mittal RD. No association of matrix metalloproteinase [MMP]-2 (- 735C> T) and tissue inhibitor of metalloproteinase [TIMP]-2 (- 418G> C) gene polymorphisms with cervical cancer susceptibility. *Indian J Clin Biochem*. 2013;28(1):13–8.
24. Biryukov J, Meyers C. Papillomavirus infectious pathways: A comparison of systems. *Viruses*. 2015;7(8):4303–25.

25. Williams VM, Filippova M, Soto U, Duerksen-Hughes PJ. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol.* 2011;6(1):45–57.
26. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(5):342–50.
27. Bhatla N, Puri K, Joseph E, Kriplani A, Iyer VK, Sreenivas V. Association of Chlamydia trachomatis infection with human papillomavirus (HPV) & cervical intraepithelial neoplasia-a pilot study. *Indian J Med Res.* 2013;137(3):533.
28. Igietseme JU, Omosun Y, Stuchlik O, Reed MS, Partin J, He Q, et al. Role of Epithelial-Mesenchyme Transition in Chlamydia Pathogenesis. *PLoS ONE.* 2015 Dezembro;10(12):e0145198.
29. Chang J-H, Huang Y-H, Cunningham CM, Han K-Y, Chang M, Seiki M, et al. Matrix metalloproteinase 14 modulates signal transduction and angiogenesis in the cornea. *Surv Ophthalmol* [Internet]. 2015 [cited 2015 Dec 29]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039625715300175>
30. Navratilova Z, Kolek V, Petrek M. Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2015;1–17.
31. 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 APJCP.* 2013;15(3):1085–91.
32. Singh N, Hussain S, Sharma U, Suri V, Nijhawan R, Bharadwaj M, et al. The protective role of the- 1306C> T functional polymorphism in matrix metalloproteinase-2 gene is associated with cervical cancer: implication of human papillomavirus infection. *Tumor Biol.* 2015;1–9.
33. Peng B, Cao L, Ma X, Wang W, Wang D, Yu L. Meta-analysis of association between matrix metalloproteinases 2, 7 and 9 promoter polymorphisms and cancer risk. *Mutagenesis.* 2010;25(4):371–9.
34. Yari K, Rahimi Z, Moradi MT. The MMP-2-735 C Allele is a Risk Factor for Susceptibility to Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 2013;15(15):6199–203.
35. Cotignola J, Roy P, Patel A, Ishill N, Shah S, Houghton A, et al. Journal of Negative Results in BioMedicine. *J Negat Results Biomed.* 2007;6:9.
36. Srivastava P, Lone TA, Kapoor R, Mittal RD. Association of promoter polymorphisms in MMP2 and TIMP2 with prostate cancer susceptibility in North India. *Arch Med Res.* 2012;43(2):117–24.
37. Beeghly-Fadiel A, Lu W, Long J-R, Shu X, Zheng Y, Cai Q, et al. Matrix metalloproteinase-2 polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(6):1770–6.

38. Yari K, Rahimi Z, Moradi MT. The MMP-2-735 C Allele is a Risk Factor for Susceptibility to Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2013;15(15):6199–203.
39. Sharma KL, Rai R, Srivastava A, Sharma A, Misra S, Kumar A, et al. A multigenic approach to evaluate genetic variants of PLCE1, LXRs, MMPs, TIMP, and CYP genes in gallbladder cancer predisposition. *Tumor Biol*. 2014;35(9):8597–606.
40. Srivastava P, Kapoor R, Mittal RD. Association of single nucleotide polymorphisms in promoter of matrix metalloproteinase-2, 8 genes with bladder cancer risk in Northern India. In: *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* [Internet]. Elsevier; 2013 [cited 2016 Jan 15]. p. 247–54. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1078143911000020>
41. Yu C, Zhou Y, Miao X, Xiong P, Tan W, Lin D. Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer. *Cancer Res*. 2004;64(20):7622–8.
42. Price SJ, Greaves DR, Watkins H. Identification of Novel, Functional Genetic Variants in the Human Matrix Metalloproteinase-2 Gene ROLE OF Sp1 IN ALLELE-SPECIFIC TRANSCRIPTIONAL REGULATION. *J Biol Chem*. 2001;276(10):7549–58.
43. Qin H, Sun Y, Benveniste EN. The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *J Biol Chem*. 1999;274(41):29130–7.
44. Ma Z, Chang MJ, Shah R, Adamski J, Zhao X, Benveniste EN. Brg-1 is required for maximal transcription of the human matrix metalloproteinase-2 gene. *J Biol Chem*. 2004;279(44):46326–34.
45. Lin H-P, Huang Y-Y, Wu H-Y, Kao J-T. Method for testing for human papillomavirus infection in patients with cervical intraepithelial disease. *J Clin Microbiol*. 2004;42(1):366–8.
46. González-Arriaga P, Pascual T, García-Alvarez A, Fernández-Somoano A, López-Cima MF, Tardón A. Genetic polymorphisms in MMP 2, 9 and 3 genes modify lung cancer risk and survival. *BMC Cancer*. 2012;12(1):121.
47. Green LS MI Urban. Cancer Institute (WIA), Chennai, India: T Rajkumar Jane, others. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16 573 women with cervical cancer and 35 509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *The Lancet*. 2007;370(9599):1609–21.
48. Vanakankovit N, Taneepanichskul S. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer. *Med J Med Assoc Thai*. 2008;91(1):7.

49. Matsumoto K, Yasugi T, Oki A, Hoshiai H, Taketani Y, Kawana T, et al. Are smoking and chlamydial infection risk factors for CIN? Different results after adjustment for HPV DNA and antibodies. *Br J Cancer*. 2003;89(5):831–3.
50. Oh HY, Kim MK, Seo S-S, Lee J-K. Association of Combined Tobacco Smoking and Oral Contraceptive Use With Cervical Intraepithelial Neoplasia 2 or 3 in Korean Women. *J Epidemiol*. 2016;26(1):22.
51. Butkiewicz D, Krześniak M, Drosik A, Giglok M, Gdowicz-Kłłosok A, Kosarewicz A, et al. The VEGFR2, COX-2 and MMP-2 polymorphisms are associated with clinical outcome of patients with inoperable non-small cell lung cancer. *Int J Cancer [Internet]*. 2015 [cited 2015 Dec 19]; Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.29605/abstract>
52. 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.
53. Cardeal LB da S, Brohem CA, Corrêa TCS, Winnischofer SMB, Nakano F, Boccardo E, et al. Higher expression and activity of metalloproteinases in human cervical carcinoma cell lines is associated with HPV presence. *Biochem Cell Biol*. 2006;84(5):713–9.
54. Cardeal LB da S, Boccardo E, Termini L, Rabachini T, Andreoli MA, Loreto C di, et al. HPV16 oncoproteins induce MMPs/RECK-TIMP-2 imbalance in primary keratinocytes: possible implications in cervical carcinogenesis. *PloS One*. 2012;7(3):e33585.
55. Kaewprag J, Umnajvjit W, Ngamkham J, Ponglikitmongkol M. HPV16 oncoproteins promote cervical cancer invasiveness by upregulating specific matrix metalloproteinases. *PloS One*. 2013;8(8):e71611.
56. Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, Kristensen G, Holm R, et al. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clin Microbiol*. 1996;34(9):2095–100.

7.CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que o genótipo TT presente no polimorfismo MMP-2 C735T parece conferir um fator protetor às lesões cervicais pré neoplásicas para a progressão maligna. No entanto, a associação dos demais genótipos e alelos presentes no -1306C/T e -735C/T não demonstraram quaisquer associações significativas entre a presença do polimorfismo e o aumento do risco de evolução das lesões. Da mesma maneira que o uso de anticonceptivo oral, o tabagismo e a infecção pelo HPV parecem não influenciar os riscos de progressão das lesões em presença dos polimorfismos -1306C/T e -735C/T. Portanto, estudos compreendendo a avaliação de mais amostras e mais cofatores devem ser realizados a fim de tentar elucidar a influência do genótipo TT -735C/T nas lesões cervicais. Assim como, avaliar uma possível influência do MMP-2 C1306T nas lesões pré neoplásicas do colo do útero.

REFERÊNCIAS

- APPLEBY, V. B. P.; OTHERS. Cervical carcinoma and sexual behavior: collaborative reanalysis of individual data on 15,461 women with cervical carcinoma and 29,164 women without cervical carcinoma from 21 epidemiological studies. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 18, n. 4, p. 1060, 2009.
- ASIH, T. S. N. et al. The Dynamics of HPV Infection and Cervical Cancer Cells. **Bulletin of Mathematical Biology**, 16 dez. 2015.
- BALTAZAR-RODRIGUEZ, L. M. et al. Polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter is associated with cervical neoplasm risk in Mexican women. **Biochemical genetics**, v. 46, n. 3-4, p. 137–144, 2008.
- BAXTER, R. C. Nuclear actions of insulin-like growth factor binding protein-3. **Gene**, v. 569, n. 1, p. 7–13, 2015.
- BERNARD, X. et al. Proteasomal degradation of p53 by human papillomavirus E6 oncoprotein relies on the structural integrity of p53 core domain. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e25981, 2011.
- BHATLA, N. et al. Association of Chlamydia trachomatis infection with human papillomavirus (HPV) & cervical intraepithelial neoplasia-a pilot study. **The Indian journal of medical research**, v. 137, n. 3, p. 533, 2013.
- BIDAN, C. M. et al. Airway and Extracellular Matrix Mechanics in COPD. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 346, 2015.
- BIRYUKOV, J.; MEYERS, C. Papillomavirus infectious pathways: A comparison of systems. **Viruses**, v. 7, n. 8, p. 4303–4325, 2015.
- BJÖRKLUND, M.; KOIVUNEN, E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1755, n. 1, p. 37–69, 25 maio 2005.
- BLEAKEN, B. M.; MENKO, A. S.; WALKER, J. L. Cells activated for wound repair have the potential to direct collective invasion of an epithelium. **Molecular biology of the cell**, p. mbc–E15, 2015.
- BONALDI, C. M. et al. Plasma levels of E-cadherin and MMP-13 in prostate cancer patients: correlation with PSA, testosterone and pathological parameters. **Tumori**, v. 101, n. 2, p. 185–188, abr. 2015.
- BOSCH, F. X. et al. Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. **Journal of clinical pathology**, v. 54, n. 3, p. 163–175, 2001.
- BUITRAGO-PÉREZ, Á. et al. Molecular signature of HPV-induced carcinogenesis: pRb, p53 and gene expression profiling. **Current genomics**, v. 10, n. 1, p. 26, 2009.

CAO, S. et al. Herpes simplex virus type 2 and the risk of cervical cancer: a meta-analysis of observational studies. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 290, n. 6, p. 1059–1066, 2014.

CAPOTE NEGRIN, L. G. Epidemiology of cervical cancer in Latin America. **ecancermedicalscience**, v. 9, 8 out. 2015.

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

CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N.; OTHERS. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. **J Natl Cancer Inst Monogr**, v. 31, p. 20–8, 2003.

CATHCART, J.; PULKOSKI-GROSS, A.; CAO, J. Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideas. **Genes & Diseases**, v. 2, n. 1, p. 26–34, 2015.

CHAGAS, B. S. et al. Novel E6 and E7 oncogenes variants of human papillomavirus type 31 in Brazilian women with abnormal cervical cytology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 16, p. 13–18, 2013a.

CHAGAS, B. S. et al. An interleukin-10 gene polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human Papillomavirus and using oral contraceptives. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 32–37, 2013b.

CHANG, J.-H. et al. Matrix metalloproteinase 14 modulates signal transduction and angiogenesis in the cornea. **Survey of ophthalmology**, 2015.

CHEN, T.-Y. et al. Role of MMP14 gene polymorphisms in susceptibility and pathological development to hepatocellular carcinoma. **Annals of surgical oncology**, v. 18, n. 8, p. 2348–2356, 2011.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Matrix metal loproteinases and the development of cancer. **Chemistry & biology**, v. 3, n. 11, p. 895–904, 1996.

COVEN, Í. et al. Presence of matrix metalloproteinase–2 and tissue inhibitor matrix metalloproteinase–2 gene polymorphisms and immunohistochemical expressions in intracranial meningiomas: Laboratory investigation. **Journal of neurosurgery**, v. 121, n. 6, p. 1478–1482, 2014.

DA SILVA, D. M. et al. Suppression of langerhans cell activation is conserved amongst human papillomavirus α and β genotypes, but not a μ genotype. **Virology**, v. 452, p. 279–286, 2014.

DA SILVA, D. M. et al. Human papillomavirus-exposed Langerhans cells are activated by stabilized Poly-I: C. **Papillomavirus Research**, v. 1, p. 12–21, 2015.

DAS, P. et al. Human papillomavirus (HPV) genome status & cervical cancer outcome - A retrospective study. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 142, n. 5, p. 525–532, nov. 2015.

DAVIDSON, B. et al. Expression of Matrix Metalloproteinase-9 in Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix—Clinicopathologic Study Using Immunohistochemistry and mRNA in Situ Hybridization. **Gynecologic oncology**, v. 72, n. 3, p. 380–386, 1999.

DECOCK, J. et al. Matrix metalloproteinases: protective roles in cancer. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 15, n. 6, p. 1254–1265, 2011.

DE FREITAS, A. C. et al. Susceptibility to cervical cancer: an overview. **Gynecologic oncology**, v. 126, n. 2, p. 304–311, 2012.

DE FREITAS, A. C.; COIMBRA, E. C.; LEITÃO, M. DA C. G. Molecular targets of HPV oncoproteins: potential biomarkers for cervical carcinogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1845, n. 2, p. 91–103, 2014.

DERYUGINA, E. I.; QUIGLEY, J. P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, n. 1, p. 9–34, 2006.

DI GREGOLI, K. et al. Differential Effects of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 on Atherosclerosis and Monocyte/Macrophage Invasion. **Cardiovascular research**, p. cvv268, 2015.

DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, p. F55–F70, 2012.

DOORBAR, J. Model systems of human papillomavirus-associated disease. **The Journal of pathology**, 2015.

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

EINSTEIN, M. H. et al. Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. **The Lancet infectious diseases**, v. 9, n. 6, p. 347–356, 2009.

FAKIOGLU, E. et al. Herpes simplex virus downregulates secretory leukocyte protease inhibitor: a novel immune evasion mechanism. **Journal of virology**, v. 82, n. 19, p. 9337–9344, 2008.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–386, 1 mar. 2015.

FERNANDES, J. V. et al. Prevalence of human papillomavirus type 58 in women with or without cervical lesions in Northeast Brazil. **Annals of medical and health sciences research**, v. 3, n. 4, p. 504–510, 2014.

FLUHR, H. et al. Human chorionic gonadotropin stimulates matrix metalloproteinases-2 and-9 in cytotrophoblastic cells and decreases tissue inhibitor of metalloproteinases-1,-2, and-3 in decidualized endometrial stromal cells. **Fertility and sterility**, v. 90, n. 4, p. 1390–1395, 2008.

FOWLKES, J. L. et al. Matrix metalloproteinases as insulin-like growth factor binding protein-degrading proteinases. **Progress in growth factor research**, v. 6, n. 2, p. 255–263, 1995.

FU, W.-M. et al. Long noncoding RNA hotair mediated angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma by direct and indirect signaling pathways. **Oncotarget**, 22 dez. 2015.

GAFFNEY, J. et al. Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. **Matrix Biology**, 2015.

GALLOWAY, D. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: shared and distinct pathways for pathogenesis. **Current Opinion in Virology**, v. 14, p. 87–92, out. 2015.

GANTI, K. et al. The human papillomavirus E6 PDZ binding motif: from Life Cycle to Malignancy. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3530–3551, 2015.

GARCÍA, S. et al. Matrix metalloproteinase-8 deficiency increases joint inflammation and bone erosion in the K/BxN serum-transfer arthritis model. **Arthritis Research and Therapy**, v. 12, n. 6, p. R224, 2010.

GHOSH, A. et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and 9 in cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma among different age groups of premenopausal and postmenopausal women. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 140, n. 9, p. 1585–1593, 2014.

GIANNANDREA, M.; PARKS, W. C. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. **Disease models & mechanisms**, v. 7, n. 2, p. 193–203, 2014.

GIANNELLI, G. et al. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. **Science**, v. 277, n. 5323, p. 225–228, 1997.

GONZÁLEZ-ARRIAGA, P. et al. Genetic polymorphisms in MMP 2, 9 and 3 genes modify lung cancer risk and survival. **BMC cancer**, v. 12, n. 1, p. 121, 2012.

GREEN, L. S. MI URBAN. CANCER INSTITUTE (WIA), CHENNAI, INDIA: T RAJKUMAR JANE; OTHERS. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16 573 women with cervical cancer and 35 509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. **The Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1609–1621, 2007.

GUAN, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. **Acta Pharmaceutica Sinica. B**, v. 5, n. 5, p. 402–418, set. 2015.

GURGEL, A. P. A. D. et al. Prevalence of human papillomavirus variants and genetic diversity in the L1 gene and long control region of HPV16, HPV31, and HPV58 found in North-East Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 130828, 2015.

HALFON, P. et al. HPV genotype distribution according to severity of cervical neoplasia using the digene HPV genotyping LQ test. **Archives of virology**, v. 158, n. 6, p. 1143–1149, 2013.

HELLNER, K.; MÜNGER, K. Human Papillomaviruses As Therapeutic Targets in Human Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 13, p. 1785–1794, 1 maio 2011.

HILDESHEIM, A.; WANG, S. S. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. **Virus research**, v. 89, n. 2, p. 229–240, 2002.

HSIAO, W. Y. et al. Dual-Specificity Phosphatase 4 Regulates STAT5 Protein Stability and Helper T Cell Polarization. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0145880–e0145880, 2014.

HUHTALA, P. et al. Completion of the primary structure of the human type IV collagenase preproenzyme and assignment of the gene (CLG4) to the q21 region of chromosome 16. **Genomics**, v. 6, n. 3, p. 554–559, 1990.

IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. Human papillomaviruses. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer**, v. 90, p. 1–636, 2007.

IGIETSEME, J. U. et al. Role of Epithelial-Mesenchyme Transition in Chlamydia Pathogenesis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0145198, Dezembro 2015.

INCA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.** Disponível em: <https://www.google.com.br/?gfe_rd=cr&ei=mWZ1VuSHMoq8wzfztopA&gws_rd=ssl#q=estimativa+inca+2014.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2015.

INCA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.** Disponível em: <https://www.google.com.br/?gfe_rd=cr&ei=mWZ1VuSHMoq8wzfztopA&gws_rd=ssl#q=estimativa+inca+2014.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2015.

JOHN, M. et al. Cervicovaginal secretions contribute to innate resistance to herpes simplex virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 10, p. 1731–1740, 2005.

JÚNIOR, S. et al. Characterization of reactive stroma in prostate cancer: involvement of growth factors, metalloproteinase matrix, sexual hormones receptors and prostatic stem cells. **International braz j urol**, v. 41, n. 5, p. 849–858, 2015.

KARLSEN, F. et al. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2095–2100, 1996.

KARSDAL, M. A. et al. Extracellular matrix remodeling: the common denominator in connective tissue diseases possibilities for evaluation and current understanding of the matrix as more than a passive architecture, but a key player in tissue failure. **Assay and drug development technologies**, v. 11, n. 2, p. 70–92, 2013.

KENNEDY, E. M. et al. Inactivation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided endonuclease. **Journal of virology**, v. 88, n. 20, p. 11965–11972, 2014.

KESH, K. et al. Association of MMP7- 181A/G promoter polymorphism with gastric cancer risk: Influence of nicotine in differential allele-specific transcription via increased phosphorylation of CREB. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc–M114, 2015.

KIM, H. I. et al. Growth-stimulatory activity of TIMP-2 is mediated through c-Src activation followed by activation of FAK, PI3-kinase/AKT, and ERK1/2 independent of MMP inhibition in lung adenocarcinoma cells. **Oncotarget**, 2015a.

KIM, Y. R. et al. Association study of five functional polymorphisms in matrix metalloproteinase-2,-3, and-9 genes with risk of primary ovarian insufficiency in Korean women. **Maturitas**, v. 80, n. 2, p. 192–197, 2015b.

LAI, H.-C. et al. Matrix metalloproteinase 1 gene polymorphism as a prognostic predictor of invasive cervical cancer. **Gynecologic oncology**, v. 96, n. 2, p. 314–319, 2005.

LANJOUW, E. et al. 2015 European guideline on the management of Chlamydia trachomatis infections. **International journal of STD & AIDS**, 24 nov. 2015.

LEE, C. et al. Low levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 at birth may be associated with subsequent development of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. **Korean journal of pediatrics**, v. 58, n. 11, p. 415–420, 2015.

LIU, D. et al. Association between polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases (MMPs) and risk of cancer metastasis: a meta-analysis. **PloS One**, v. 7, n. 2, p. e31251, 2012.

LIZOTTE-WANIEWSKI, M.; BREW, K.; HENNEKENS, C. H. Hypothesis Metalloproteinase Inhibitors Decrease Risks of Cardiovascular Disease. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, p. 1074248415615237, 2015.

LÖFFEK, S.; SCHILLING, O.; FRANZKE, C.-W. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. **European Respiratory Journal**, v. 38, n. 1, p. 191–208, 2011.

LONGWORTH, M. S.; LAIMINS, L. A. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. **Journal of virology**, v. 78, n. 7, p. 3533–3541, 2004.

LONGWORTH, M. S.; WILSON, R.; LAIMINS, L. A. HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. **The EMBO journal**, v. 24, n. 10, p. 1821–1830, 2005.

MACCOLL, E.; KHALIL, R. A. Matrix Metalloproteinases as Regulators of Vein Structure and Function: Implications in Chronic Venous Disease. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 355, n. 3, p. 410–428, 2015.

MAGAÑA-CONTRERAS, M. et al. Prevalence of sexually transmitted pathogens associated with HPV infection in cervical samples in a Mexican population. **Journal of medical virology**, 2015.

MARAL, S. et al. Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Polymorphism in Patients With Myeloproliferative Diseases: A STROBE-Compliant Observational Study. **Medicine**, v. 94, n. 16, p. e732, 2015.

MATSUMOTO, K. et al. Are smoking and chlamydial infection risk factors for CIN? Different results after adjustment for HPV DNA and antibodies. **British journal of cancer**, v. 89, n. 5, p. 831–833, 2003.

MATSUMOTO, K.; YOSHIKAWA, H. Human papillomavirus infection and the risk of cervical cancer in Japan. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 39, n. 1, p. 7–17, 2013.

MA, Z. et al. Brg-1 is required for maximal transcription of the human matrix metalloproteinase-2 gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 44, p. 46326–46334, 2004.

MELDOLESI, J. Pharmacology of the cell/matrix form of adhesion. **Pharmacological research**, 2015.

MEYER, E. et al. Matrix metalloproteinases 9 and 10 inhibit protein kinase C–potentiated, p53-mediated apoptosis. **Cancer research**, v. 65, n. 10, p. 4261–4272, 2005.

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.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550–560, 2010.

MOON, Y. W. et al. Targeting the indoleamine 2, 3-dioxygenase pathway in cancer. **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2015.

MORENO, V. et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. **The Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1085–1092, 2002.

NANNURU, K. C. et al. Matrix Metalloproteinase (MMP)-13 Regulates Mammary Tumor-Induced Osteolysis by Activating MMP9 and Transforming Growth Factor- β Signaling at the Tumor-Bone Interface. **Cancer research**, v. 70, n. 9, p. 3494–3504, 2010.

NATARAJAN, T. et al. Idoine chloride induced p53 dependent apoptosis in cervical cancer cells through inhibition of viral oncoproteins. **Biochimie**, v. 121, p. 13–20, 2016.

NAVARRO, M. G.-J. et al. Api5 contributes to E2F1 control of the G1/S cell cycle phase transition. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e71443, 2013.

NAVRATILOVA, Z.; KOLEK, V.; PETREK, M. Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, p. 1–17, 2015.

NÉJIMA, D. B. et al. Prognostic impact of polymorphism of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase tissue inhibitor-2 promoters in breast cancer in Tunisia: case-control study. **Tumor Biology**, v. 36, n. 5, p. 3815–3822, 2015.

NISSINEN, L.; KÄHÄRI, V.-M. Matrix metalloproteinases in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1840, n. 8, p. 2571–2580, 2014.

NUNES, J. D. C. et al. Molecular detection of human papillomavirus in Brazilian women with cervical intraepithelial neoplasia in a northeast Brazilian city. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 13, n. 4, p. 9077, 2014.

ORTEGA, N.; WERB, Z. New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. **Journal of cell science**, v. 115, n. 22, p. 4201–4214, 2002.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 8, n. 3, p. 221–233, 2007.

PAHO. **Cancer in the Americas. Basic Indicators 2013**. Disponível em: <https://www.google.com.br/?gfe_rd=cr&ei=mWZ1VuSHMoq8wzfztopA&gws_rd=ssl#q=%22Cancer+in+the+Americas.+Basic+Indicators+2013.%22>. Acesso em: 19 dez. 2015a.

PAHO. **Cancer in the Americas Country Profiles 2013**. Washington, D.C.: 2013., 2013b. Disponível em: <<http://www.uicc.org/sites/main/files/private/Cancer-Country-Profiles-2013-ENG.pdf>>. Acesso em: 19 dez. 2015

PAHWA, S.; STAWIKOWSKI, M. J.; FIELDS, G. B. Monitoring and inhibiting MT1-MMP during cancer initiation and progression. **Cancers**, v. 6, n. 1, p. 416–435, 2014.

PENG, Y.-P. et al. Elevation of MMP-9 and IDO induced by pancreatic cancer cells mediates natural killer cell dysfunction. **BMC cancer**, v. 14, n. 1, p. 738, 2014.

PINTO, D. G. C.; COSTA, M. A. C.; MARQUES, M. L. DE A. C. O Índice de Desenvolvimento Humano Municipal brasileiro. 2013.

PORTARI, E. A. et al. Immunohistochemical expression of cyclin D1, p16Ink4a, p21WAF1, and Ki-67 correlates with the severity of cervical neoplasia. **International Journal of Gynecologic Pathology**, v. 32, n. 5, p. 501–508, 2013.

PRIOR, S. H. et al. Charge-Triggered Membrane Insertion of Matrix Metalloproteinase-7, Supporter of Innate Immunity and Tumors. **Structure**, v. 23, n. 11, p. 2099–2110, 2015.

PUSHPAKUMAR, S. et al. DNA hypermethylation in hyperhomocysteinemia contributes to abnormal extracellular matrix metabolism in the kidney. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 11, p. 4713–4725, 2015.

QIN, H.; SUN, Y.; BENVENISTE, E. N. The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 41, p. 29130–29137, 1999.

RAHIMI, Z.; YARI, K.; RAHIMI, Z. Matrix metalloproteinase-9 -1562T allele and its combination with MMP-2 -735 C allele are risk factors for breast cancer. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 16, n. 3, p. 1175–1179, 2015.

RAJKUMAR, T. et al. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies-International collaboration of epidemiological studies of cervical cancer. **International journal of cancer**, v. 118, n. 6, p. 1481–1495, 2006.

RASOOL, M. et al. The role of epigenetics in personalized medicine: challenges and opportunities. **BMC medical genomics**, v. 8, n. Suppl 1, p. S5, 2015.

RASTOGI, N. et al. Proteasome inhibition mediates p53 reactivation and anti-cancer activity of 6-Gingerol in cervical cancer cells. **Oncotarget**, 2015.

RICCI, S.; BRUZZESE, D.; DI CARLO, A. Evaluation of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, NGAL and MMP-9/NGAL complex in urine and sera from patients with bladder cancer. **Oncology letters**, v. 10, n. 4, p. 2527–2532, 2015.

RIECK, G.; FIANDER, A. The effect of lifestyle factors on gynaecological cancer. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 20, n. 2, p. 227–251, 2006.

ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. **Developmental biology**, v. 341, n. 1, p. 126–140, 2010.

SAID, A. H.; RAUFMAN, J.-P.; XIE, G. The role of matrix metalloproteinases in colorectal cancer. **Cancers**, v. 6, n. 1, p. 366–375, 2014.

SANTO, L.; SIU, K. T.; RAJE, N. **Targeting Cyclin-Dependent Kinases and Cell Cycle Progression in Human Cancers** Seminars in Oncology. **Anais...Elsevier**, 2015Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093775415001943>>. Acesso em: 23 dez. 2015

SANTOS-LÓPEZ, G. et al. [General aspects of structure, classification and replication of human papillomavirus]. **Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v. 53, p. S166, 2015.

SERRANO, B. et al. Human papillomavirus genotype attribution for HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 and 58 in female anogenital lesions. **European journal of cancer**, v. 51, n. 13, p. 1732–1741, 2015.

SHAO, J.-Y. et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase 2 promoter is closely associated with high risk of nasopharyngeal carcinoma in Cantonese from southern China. **Chinese journal of cancer**, v. 30, n. 9, p. 620–626, 2011.

SHEU, B.-C. et al. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. **Cancer research**, v. 61, n. 1, p. 237–242, 2001.

SINGH, H.; JAIN, M.; MITTAL, B. MMP-7 (- 181A> G) promoter polymorphisms and risk for cervical cancer. **Gynecologic oncology**, v. 110, n. 1, p. 71–75, 2008.

SINGH, N. et al. The protective role of the- 1306C> T functional polymorphism in matrix metalloproteinase-2 gene is associated with cervical cancer: implication of human papillomavirus infection. **Tumor Biology**, p. 1–9, 2015.

SINGH, R. D.; PATEL, K. R.; PATEL, P. S. p53 mutation spectrum and its role in prognosis of Oral Cancer patients: A study from Gujarat, West India. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 2015.

SMITH, J. S. et al. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 21, p. 1604–1613, 2002.

SONG, J. et al. MicroRNA-222 regulates MMP-13 via targeting HDAC-4 during osteoarthritis pathogenesis. **BBA Clinical**, v. 3, p. 79–89, 2015.

SRIVASTAVA, P. et al. No association of matrix metalloproteinase [MMP]-2 (-735C> T) and tissue inhibitor of metalloproteinase [TIMP]-2 (-418G> C) gene polymorphisms with cervical cancer susceptibility. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 28, n. 1, p. 13–18, 2013.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 17, p. 463, 2001.

STRICKER, T. P. et al. Structural analysis of the $\alpha 2$ integrin I domain/procollagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) interaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 31, p. 29375–29381, 2001.

SUN, W. et al. Knockdown of TMEM45A inhibits the proliferation, migration and invasion of glioma cells. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 10, p. 12657–12667, 2015.

SUPASORN, O. et al. Matrix metalloproteinases contribute to the regulation of chemokine expression and pulmonary inflammation in *Cryptococcus* infection. **Clinical & Experimental Immunology**, 2015.

SWINEHART, I. T.; BADYLAK, S. F. Extracellular matrix bioscaffolds in tissue remodeling and morphogenesis. **Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, 23 dez. 2015.

TACHEVA, T. et al. Frequency of the common promoter polymorphism MMP2-1306 C> T in a population from central Bulgaria. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 351–356, 2015.

THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced drug delivery reviews**, 2015.

THOMAS, D. B. et al. Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. I. Risk factors for invasive cervical carcinomas with human papillomavirus types 16 and 18 DNA. **American journal of epidemiology**, v. 153, n. 8, p. 723–731, 2001.

TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Gelatinases (MMP-2 and-9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. **Biochimie**, v. 87, n. 3, p. 287–297, 2005.

UČAKAR, V. et al. Pre-vaccination prevalence of infections with 25 non-high-risk human papillomavirus types among 1,000 Slovenian women in cervical cancer screening. **Journal of medical virology**, v. 86, n. 10, p. 1772–1779, 2014.

VANAKANKOVIT, N.; TANEEPANICHSKUL, S. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer. **Medical journal of the Medical Association of Thailand**, v. 91, n. 1, p. 7, 2008.

VANDENBROUCKE, R. E.; LIBERT, C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 12, p. 904–927, 2014.

VENUTI, A. et al. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. **Mol Cancer**, v. 10, n. 1, p. 140, 2011.

VERMA, S. et al. An Overview of Matrix Metalloproteinase 9 Polymorphism and Gastric Cancer Risk. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 16, n. 17, p. 7393–7400, 2014.

WANG, G. et al. MicroRNA-411 inhibited matrix metalloproteinase 13 expression in human chondrocytes. **American journal of translational research**, v. 7, n. 10, p. 2000, 2015.

WANG, S. et al. Identification of α 2-Macroglobulin as a Master Inhibitor of Cartilage-Degrading Factors That Attenuates the Progression of Posttraumatic Osteoarthritis. **Arthritis & rheumatology**, v. 66, n. 7, p. 1843–1853, 2014.

WANG, Y. et al. Loss of P53 facilitates invasion and metastasis of prostate cancer cells. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 384, n. 1-2, p. 121–127, 2013.

WHO. **WHO Guidelines for Screening and Treatment of Precancerous Lesions for Cervical Cancer Prevention**. Geneva: World Health Organization, 2013.

WHO. **Comprehensive Cervical Cancer Control: A Guide to Essential Practice**. 2nd. ed. Geneva: World Health Organization, 2014.

WILLIAMS, V. M. et al. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. **Future virology**, v. 6, n. 1, p. 45–57, 2011.

WILSON, C. L. et al. Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 4, p. 1402–1407, 1997.

WU, Z. et al. Relationship between single-nucleotide polymorphism of matrix metalloproteinase-2 gene and colorectal cancer and gastric cancer susceptibility: a meta-analysis. **OncoTargets and Therapy**, v. 8, p. 861–869, 2015.

XIE, B. et al. Genetic polymorphisms in MMP 2, 3, 7, and 9 genes and the susceptibility and clinical outcome of cervical cancer in a Chinese Han population. **Tumor Biology**, p. 1–6, 2015.

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. 1085–1091, 2013.

YAN, X. et al. High-risk human papillomavirus type 18 E7 caused p27 elevation and cytoplasmic localization. **Cancer biology & therapy**, v. 9, n. 9, p. 728–735, 2010.

YARI, K.; RAHIMI, Z.; MORADI, M. T. The MMP-2-735 C Allele is a Risk Factor for Susceptibility to Breast Cancer. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 15, n. 15, p. 6199–6203, 2013.

YOON, S.-O. et al. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. **BMB Reports**, v. 36, n. 1, p. 128–137, 2003.

YOSHII, N. et al. Successful implantation after reducing matrix metalloproteinase activity in the uterine cavity. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 11, n. 37, p. 37, 2013.

YU, Q.; STAMENKOVIC, I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. **Genes & development**, v. 14, n. 2, p. 163–176, 2000.

ZHANG, F. et al. Elevated STAT3 Signaling-Mediated Upregulation of MMP-2/9 Confers Enhanced Invasion Ability in Multidrug-Resistant Breast Cancer Cells. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 10, p. 24772–24790, 2015.

ZHANG, G. et al. Matrix metalloproteinase-10 promotes tumor progression through regulation of angiogenic and apoptotic pathways in cervical tumors. **BMC cancer**, v. 14, n. 1, p. 310, 2014.

ZHANG, L.; XI, R. X.; ZHANG, X. Z. Matrix metalloproteinase variants associated with risk and clinical outcome of esophageal cancer. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 14, n. 2, p. 4616, 2015.

ZHONG, W.-Q. et al. M2-polarized macrophages in keratocystic odontogenic tumor: relation to tumor angiogenesis. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

ZIDI, S. et al. Evaluation of Toll-Like Receptors 2/3/4/9 Gene Polymorphisms in Cervical Cancer Evolution. **Pathology & Oncology Research**, p. 1–8, 2015.

ŽIVADINOVIĆ, R. et al. Persistent human papillomavirus infection in the etiology of cervical carcinoma: The role of immunological, genetic, viral and cellular factors. **Srpski arhiv za celokupno lekarstvo**, v. 142, n. 5-6, p. 378–383, 2014.

ZUR HAUSEN, H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. **Virology**, v. 184, n. 1, p. 9–13, 1991.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, 2002.

ANEXO A- PARECER CONSUBSTANCIADO 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: Caracterização do perfil molecular associado à infecção pelo Papilomavirus Humano: identificação de novos marcadores moleculares e alvos terapêuticos.

Pesquisador: Antonio Carlos de Freitas

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 03606212.7.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 159.859

Data da Relatoria: 30/11/2012

Apresentação do Projeto:

Indicada na apresentação inicial.

Objetivo da Pesquisa:

Indicada na apresentação inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Indicada na apresentação inicial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Indicada na apresentação inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Indicada na apresentação inicial.

Recomendações:

Indicada na apresentação inicial.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

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-



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, por meio de ofício impresso, após a entrega do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.

RECIFE, 30 de Novembro de 2012

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

ANEXO B- PROTOCOLO DE PESQUISA CEP-HUOC/PROCAPE



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS COMPLEXO HOSPITALAR HUOC/PROCAPE

PROTOCOLO DE PESQUISA CEP-HUOC/PROCAPE

Protocolo CEP-HUOC/PROCAPE: 64/2010

CAAE: 0058.0.106.000-10

Local da pesquisa: HUOC

Setor: CEON – Centro de Oncologia

Pesquisador principal: MARIA TEREZA CARTAXO MUNIZ

Nome da pesquisa: Avaliação dos polimorfismos dos oncogenes E6 e E7 dos HPVs 16, 18, 31 e os polimorfismos nos genes IL10, MBL2, TNFalfa e TP53 em pacientes do Centro de Oncologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz: Um estudo voltado à políticas públicas de impacto social.

Documentos recebidos:

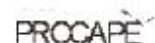
- (x) Folha de rosto
- (x) Projeto de pesquisa com CD
- (x) Termo de Ciência e Aprovação
- (x) Carta de Anuência
- (x) Termo de Confidencialidade
- (x) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE
- (x) Orçamento financeiro
- (x) Cronograma
- () Pendências solicitadas pelo relator
- () Brochura do Investigador
- () Emenda(s)
- () Efeito(s) adverso(s)
- () Relatório parcial
- () Relatório atualizado
- () Relatório final

Recebido em: 30/04/2009

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CEP / HUOC / PROCAPE / UPE
RECEBIMENTO 30/04/10
Ass. *[Assinatura]*

CEP - HUOC/PROCAPE

Pavilhão Ovídio Montenegro – 1º andar
Rua Arnóbio Marques, 310 – Santo Amaro – 50100-130 – Recife-PE.
Fone: (81) 3184.1460 – Fone/Fax: (81) 3184.1271 - E-mail: cep_huoc.procape@yahoo.com.br



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
COMPLEXO HOSPITALAR HUOC/PROCAPE**

Reunião: 25/05/2010

Protocolo CEP – HUOC/PROCAPE:nº 64/2010
CAAE: 0058.0.106.000-10

Projeto: Avaliação dos polimorfismos dos oncogenes E6 e E7 dos HPVs 16, 18, 31 e os polimorfismos nos genes IL10, MBL2, TNF α e TP53 em pacientes do Centro de Oncologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz: Um estudo voltado à políticas públicas de impacto social.

Pesquisador Principal: Maria Tereza Cartaxo Muniz

Resultado:

- Resultado do Projeto – **APROVADO**

Magaly Bushatsky
Vice-coordenadora
CEP-HUOC/PROCAPE

Pavilhão Ovidio Montenegro – 1º andar
Rua Arnóbio Marques, 310 – Santo Amaro – 50100-130 – Recife-PE.
Fone: (81) 3184.1460 – Fone/Fax: (81) 3184.1271 - E-mail: cep_huoc.procape@yahoo.com.br

30/4/2010

CAAE - Certificado de Apresentação p...



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PROJETO RECEBIDO NO CEP

CAAE - 0058.0.106.000-10

Projeto de Pesquisa

Avaliação dos polimorfismos dos oncogenes E6 e E7 dos HPV's 16, 18, 31 e os polimorfismos nos genes IL10, MBL2, TNFalfa e TP53 em pacientes do Centro de Oncologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz. Um estudo voltado à políticas públicas de impacto social.

Ato(s) Temático(s) Especial(s)

Genética Humana - Biossegurança

Pesquisador Responsável

Grupo

Fase

Não se aplica

CPF

49671936415

Pesquisador Responsável

MARIA TEREZA CARTAXO MUNIZ

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

v

Prof. Dr. Marjorie

de Sa

Comitê de Ética

RECEBIMENTO

v

Prof. Dr. Marjorie

de Sa

Data de Entrega

30/04/2010

Recebimento:

v

Prof. Dr. Marjorie

de Sa

Assinatura

Este documento deverá ser, obrigatoriamente, anexado ao Projeto de Pesquisa.