

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Naiara Soares Melo da Silva

Estudo sobre a Expressão da Metaloproteinase de matriz 7 (MMP-7), a infecção pelos Vírus HPV e EBV e o grau de malignidade de Lesões do Colo Uterino

São Carlos

2016

Naiara Soares Melo da Silva

Estudo sobre a Expressão da Metaloproteinase de matriz 7 (MMP-7), a infecção pelos Vírus HPV e EBV e o grau de malignidade de Lesões do Colo Uterino

**Dissertação de Mestrado
apresentada à Universidade
Federal de São Carlos para
obtenção do título de mestre em
Genética e Evolução**

Área de Concentração: Biologia Molecular e Bioquímica

Orientadora: Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo

Co-orientadora: Priscila Maria de Andrade Borra

São Carlos

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Se Silva, Naiara Soares Melo da
Estudo sobre a expressão da metaloproteinase de matriz 7 (MMP-7), a infecção pelos vírus HPV e EBV e o grau de malignidade de lesões do colo uterino / Naiara Soares Melo da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
48 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Câncer. 2. Colo uterino. 3. MMP-7. 4. Imunohistoquímica. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia
Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Naiara Soares Melo da Silva, realizada em 20/04/2016:

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Sellstre de Araujo
UFSCar

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Profa. Dra. Leila Maria Beltramini
IFSC/USP

Dedico este trabalho a Deus que é o meu refúgio e fortaleza em todos os momentos e a sua fidelidade é infinita.

Dedico também a minha família, pois a eles devo toda a minha formação educacional, como cidadã e como ser humano e por todo amor, carinho e paciência incondicionais, fundamental para a realização deste trabalho.

Portanto, quer comais, quer bebais, ou façais qualquer outra coisa, fazei tudo para a glória de Deus. 1Coríntios 10:31

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo, minha orientadora, pelo exemplo de dedicação e perseverança no progresso da ciência, mas sobretudo pelo respeito ao próximo.

À Profa. Dra Priscila Maria de Andrade Borra, minha co-orientadora, que me guiou em vários momentos deste estudo, pelos conselhos, dedicação e paciência.

Ao querido Prof. Ricardo Carneiro Borra por todo o esforço e auxílio em todas as questões práticas, opiniões e paciência no tocante ao desenvolvimento do estudo e por fornecer a possibilidade de desenvolver este estudo no Laboratório de Imunologia Aplicada/Departamento de Genética e Evolução.

Ao Dr. André Malavazi pelo incentivo e por fornecer os blocos de parafina, material de estudo do projeto.

Aos colegas e amigos do laboratório pelo grande auxílio ao transmitir-me suas experiências, sugestões, pela troca de opiniões e informações relevantes e por toda amizade construída durante o tempo de convivência.

À CAPES e FAPESP, entidades científicas patrocinadoras deste estudo.

Resumo

O câncer cervical é responsável pela segunda maior causa de mortes por neoplasia malignas entre as mulheres no mundo. Muitos estudos comprovam a importância do vírus HPV no surgimento do câncer cervical, porém devido à natureza monoclonal desta neoplasia, suspeita-se que a infecção pelo HPV não possa ser considerada o único fator causal responsável pelo desenvolvimento do carcinoma de colo de útero. Estudos já apontaram que o EBV pode ter um papel de cooperação com o HPV16 no desenvolvimento tumoral. Tal cooperação poderia influenciar o microambiente tumoral criando um nicho favorável para a sua progressão. Células de câncer secretam enzimas que degradam a matriz extracelular (MEC). Tais enzimas, como as metaloproteinases de matriz (MMPs) facilitam a movimentação celular nos tecidos e induzem a atividade de fatores de crescimento que promovem a angiogênese. Dentre o grupo das MMPs, a MMP-7 parece ter papel crucial no desenvolvimento da carcinogênese, pois sua ação já foi associada com a clivagem e a liberação de importantes moléculas de adesão. Neste sentido, foi realizado este estudo para estabelecer a relação entre a co-infecção HPV/EBV e a expressão da MMP-7. Foram examinadas imunohistoquimicamente lâminas histológicas de biópsias de lesões de colo uterino de 60 pacientes com idades entre 35 e 65 anos. As amostras foram divididas em lesão de alto grau e de baixo grau e avaliados semiquantitativamente através de um sistema de escore variando de 0 à ++++. Índices histopatológicos quanto ao grau das lesões foram estabelecidos. Foi observada uma associação estatisticamente significativa entre a lesão de alto grau, a expressão da MMP-7 e a presença do vírus HPV, com $p=0,007$ na porção da junção escamocolunar e $p=0,023$ na porção da ectocérvice.

Palavras-chave: Câncer, colo uterino, MMP-7, Imunohistoquímica

SUMMARY

Cervical cancer is the second largest cause of deaths from malignant cancer among women worldwide. Many studies show the importance of the HPV virus in the onset of cervical cancer, but because of the monoclonal nature of this cancer, it is suspected that HPV infection may not be considered the only causal factor responsible for the development of cervical carcinoma. Studies have indicated that EBV may have a role in cooperation with the HPV16 tumor development. Such cooperation could influence the tumor microenvironment by creating a favorable niche for its progression. Cancer cells secrete enzymes that degrade the extracellular matrix (ECM). Such enzymes such as matrix metalloproteinases (MMPs) facilitate cell movement in tissues and induce the activity of growth factors that promote angiogenesis. Among the group of MMPs, MMP-7 seems to have a crucial role in the development of carcinogenesis, since its action has been associated with the cleavage and release of adhesion molecules important. In this sense, this study was performed to establish the relationship between the HPV coinfection / EBV and expression of MMP-7. They were examined immunohistochemically histological slides of cervical lesions biopsies of 60 patients aged 35 to 65 years. The samples were divided into high grade lesion and low grade and evaluated semiquantitatively by scoring system ranging from 0 to ++++. Histopathological indexes the degree of injury were established. It observed a statistically significant association between high-grade lesion, the expression of MMP-7 and the presence of the HPV virus, with $p = 0.007$ at the junction portion squamocolumnar and $p = 0.023$ in the portion of the ectocervix. This correlation

Keywords: cancer, cervical, MMP-7, Immunohistochemistry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Endocérvice e ectocérvice. Junção escamocolunar (JEC)

Figura 2. Progressão da neoplasia intraepitelial cervical (NIC)

Figura 3. Genoma do vírus HPV

Figura 4. Integração do genoma viral ao genoma hospedeiro

Figura 5. Fatores que contribuem para o desenvolvimento do câncer cervical

Figura 6. Organização do genoma do EBV

Figura 7. Ativação de uma pró-enzima através da clivagem do pré-domínio

Figura 8. Estrutura da matrilisina (MMP-7)

Figura 6.1. Grupo controle. Imunomarcacão MMP-7 nas porções das amostras Controle (0% de imunomarcacão)

Figura 6.2 Grupo NIC I. Imunomarcacão MMP-7 nas porções das amostras lesionadas com grau I de neoplasia (30% de imunomarcacão)

Figura 6.3 Grupo NIC II. Imunomarcacão MMP-7 nas porções das amostras lesionadas com grau II de neoplasia (60% de imunomarcacão)

Figura 6.4 Grupo NIC III. Imunomarcacão MMP-7 nas porções das amostras lesionadas com grau II de neoplasia (90% de imunomarcacão)

Figura 6.5 Grupo Controle. Imunomarcacão do HPV nas porções de amostras controle (0% de imunomarcacão)

Figura 6.6 Grupo NIC I. Imunomarcacão do HPV nas porções das amostras lesionadas com grau I de neoplasia (30% de imunomarcacão)

Figura 6.7 Grupo NIC II. Imunomarcacão do HPV nas porções das amostras lesionadas com grau I de neoplasia (60% de imunomarcacão)

Figura 6.8 Grupo NIC III. Imunomarcação do HPV nas porções das amostras lesionadas com grau I de neoplasia (90% de imunomarcação)

Figura 6.9 Grupo NIC I. Imunomarcação do vírus EBV nas porções de amostras com grau de lesão I (27% de imunomarcação)

Figura 6.10 Grupo NIC III. Imunomarcação do vírus EBV nas porções de amostras com grau de lesão III (97% de imunomarcação)

LISTA DE QUADROS

Quadro 6.1 Relação entre expressão de MMP7 e presença de HPV16/18

Quadro 6.2 *Relação entre expressão de MMP7 e presença de EBV*

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1. Relação de anticorpos utilizados

Tabela 5.2. Distribuição das amostras de acordo com o grau de lesão

Tabela 6.1 Correlação entre a expressão da proteína MMP-7 e o grau de lesão no tecido do colo uterino (endocérvice)

Tabela 6.2 Correlação entre a expressão da proteína MMP-7 e o grau de lesão no tecido do colo uterino (JEC)

Tabela 6.3 Correlação entre a expressão da proteína MMP-7 e o grau de lesão no tecido do colo uterino (ectocérvice)

Tabela 6.4 Correlação entre a expressão da proteína MMP-7 e o grau de lesão no tecido do colo uterino (Tecido conjuntivo – endocérvice)

Tabela 6.5 Correlação entre a expressão da proteína MMP-7 e o grau de lesão no tecido do colo uterino (Tecido conjuntivo – JEC)

Tabela 6.6 Correlação entre a expressão da proteína MMP-7 e o grau de lesão no tecido do colo uterino (Tecido conjuntivo – ectocérvice)

Tabela 6.7 Correlação entre a expressão da proteína MMP-7 e o grau de lesão no tecido do colo uterino (Glândulas)

Tabela 6.8 Correlação entre a presença do HPV e o grau de lesão no tecido do colo uterino

Tabela 6.9 Correlação entre a presença do HPV e o grau de lesão no tecido do colo uterino

Tabela 6.10 Correlação entre a presença do HPV e o grau de lesão no tecido do colo uterino

Tabela 6.11 Correlação entre a presença do HPV e o grau de lesão no tecido do colo uterino

Tabela 6.12 Correlação entre a presença do EBV e o grau de lesão no tecido do colo uterino

Tabela 6.13 Correlação entre a presença do EBV e o grau de lesão no tecido do colo uterino

Tabela 6.14 Correlação entre a presença do EBV e o grau de lesão no tecido do colo uterino

Tabela 6.15 Correlação entre a presença do EBV e o grau de lesão no tecido do colo uterino

ABREVIações

ASCUS	Atypical squamous cells of undetermined significance (Células escamosas atípicas de significado indeterminado)
EBV	Epstein-Barr Vírus
ECM	Extracellular matrix
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência)

	Adquirida)
HPV	Human papillomavírus (Vírus do papiloma humano)
HSIL	High grade squamous intraepithelial lesion (Lesão Intraepitelial Escamosa de alto grau)
IHC	Immunohistochemistry (imunohistoquímica)
LSIL	Low grade squamous intraepithelial lesion (Lesão Intraepitelial Escamosa de baixo grau)
MMP	Matrix metalloproteinase (Metaloproteinase de matriz)
MMP-7	Matrix metalloproteinase 7 (Metaloproteinase de matriz 7)
NIC	Cervical Intraepithelial neoplasia (Neoplasia Intraepitelial Cervical)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Salina Tamponada com Fosfato)
SCJ	Junction Squamocolumnar (Junção Escamocolunar)
SIL	Squamous Intraepithelial lesion (Lesão Intraepitelial Escamosa)
SUS	Sistema Único de Saúde
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases (Inibidores teciduais de metaloproteinases)
ZT	Transformation zone (Zona de Transformação)

ÍNDICE

ÍNDICE	4
ABREVIACÕES	6
1. INTRODUÇÃO	8
2. Revisão da Literatura	
2.1 Câncer Cervical.....	9
2.2 Colo do Útero.....	13
2.3 Neoplasia Intraepitelial Cervical.....	15
2.4 Vírus do Papiloma Humano.....	17
2.5 Fatores de Risco.....	22
2.6 Epstein-Barr Vírus.....	24
2.7 Matriz Extracelular	27
2.8 Metaloproteinases de matriz.....	29
2.9 Matrilisina (MMP-7).....	34
2.10 Carcinogênese.....	37
3. JUSTIFICATIVA	39
4. OBJETIVOS	
4.1 Objetivo Geral.....	42
4.2 Objetivos Específicos.....	42
5. CASUÍSTICA E MÉTODOS	43
5.1 Pacientes.....	44
5.2 Morfologia.....	45

5.3 Imuno-histoquímica.....	46
5.4 Análise Histomorfométrica.....	48
5.5 Análise Estatística.....	49
6. RESULTADOS.....	50
6.1 Análise da Imuno-histoquímica.....	51
6.2 Análise das imagens da imunorreatividade da MMP-7.....	52
6.3 Associação entre MMP-7 e o grau da lesão.....	54
6.4 Análise imunohistoquímica HPV.....	56
6.5 Análise imunohistoquímica EBV.....	59
6.6 Análise Estatística.....	62
7. DISCUSSÃO.....	65
8. CONCLUSÃO.....	71
9. REFERÊNCIAS.....	73

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer, também conhecido como neoplasia maligna, é o nome genérico dado a um grupo de mais de 200 doenças (INCA, 2015). O crescimento anormal e fora de controle das células, associado com o processo de metástase é a característica comum destas doenças, que podem levar à morte. O câncer é uma síndrome multifatorial, onde diversos fatores internos e externos, tais como: tabagismo, organismos infecciosos, dieta não saudável, mutações, hormônios e condições de supressão imunológica concorrem e se sobrepõem para o seu desenvolvimento (America Cancer Society, 2016).

O câncer do colo do útero, também conhecido como carcinoma cervical, tornou-se o segundo maior causador de mortes por neoplasia maligna entre as mulheres no mundo (ANDERSON *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2015; XIE *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2011), com uma incidência anual aproximada de 530.000 casos e 265.000 mortes (WHO, 2015). Ao mesmo tempo, é o câncer com o maior potencial de prevenção e de cura quando diagnosticado precocemente (JEMAL *et al.*, 2010).

Estudos epidemiológicos tem estabelecido uma associação etiológica entre a infecção do vírus do papiloma humano (HPV) e o desenvolvimento do câncer cervical. Estudos comprovam que a maioria dos cânceres cervicais é causada pela infecção persistente de alguns subtipos deste vírus (HERFS *et al.*, 2012).

O vírus do Papiloma Humano (HPV) é o principal fator envolvido no desenvolvimento do câncer cervical com 170 subtipos já identificados e categorizados em genótipos de baixo risco e alto risco, dependendo de seu potencial oncogênico (WARREN *et al.*, 2014; Herfs *et al.*, 2013). Muitos estudos comprovam a sua importância no surgimento do câncer cervical, no entanto a sua atividade provavelmente não é causa suficiente para o desenvolvimento do carcinoma cervical em função da natureza monoclonal desta neoplasia (KESSLER,1986; LENH *et al.*,1988; MARINHO-DIAS *et al.*, 2013). Portanto há uma necessidade de identificação de outros fatores,

possivelmente de origem viral que, agindo de forma sinérgica, auxiliam na indução e progressão deste tipo de neoplasia (COLLINS *et al.*, 2009).

Possíveis agentes como por exemplo o *Epstein-Barr Vírus* (EBV), estão sendo investigados como possíveis candidatos no envolvimento da carcinogênese cervical (KAHLA *et al.*, 2012).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma Cervical

A infecção pelo vírus HPV é comum entre mulheres saudáveis, entretanto a sua persistência pode resultar no desenvolvimento de lesões pré-cancerosas e, que podem evoluir para o câncer invasivo. Do total de mulheres infectadas, uma pequena porcentagem desenvolverá a neoplasia em seu estágio mais avançado visto que, algumas condições podem auxiliar no aumento de risco do desenvolvimento da neoplasia, tais como o sistema imunológico suprimido, grau de paridade, tabagismo e uso prolongado de contraceptivos orais (XIE et al., 2015; American Cancer Society, 2016).

Há duas principais categorias de carcinomas invasores do colo do útero: o carcinoma epidermóide, tipo mais incidente e que acomete o epitélio escamoso (80% dos casos), e o adenocarcinoma, considerado o tipo mais raro e que acomete o epitélio glandular (10% dos casos) (American Cancer Society, 2016).

Dados do INCA indicam que no Brasil o carcinoma cervical é a quarta doença mais comum entre mulheres, com estimativas de 16.340 novos casos em 2016. Na região Norte do Brasil é o principal tipo de neoplasia que afeta as mulheres, já na região Sul é o quarto tipo mais prevalente, devido à menor exposição ao vírus HPV (INCA, 2016).

Em países desenvolvidos como o Japão e EUA o câncer cervical é um dos tipos de malignidade mais comuns (40-80%) que afetam o trato genital feminino (XIE et al., 2015; Okamoto et al., 2003). Contudo, a incidência em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, como China e Índia, é seis vezes maior (WU et al., 2011), em função da carência de exames preventivos que podem detectar a doença em sua fase inicial e que poderia favorecer as chances de eficácia no tratamento da doença (SINGH et al., 2012).

Geralmente, os sintomas das lesões pré-cancerosas e do câncer em estágio precoce são imperceptíveis. Quando visíveis, os sintomas mais recorrentes são sangramento vaginal anormal, sangramento após a menopausa, hemorragias e manchas de sangue entre os períodos menstruais e dores durante a relação sexual (American Cancer Society, 2016). As melhores formas de prevenção ainda são esquivar-se da exposição ao vírus e realizar os exames de triagem, que podem encontrar possíveis lesões. Estas ações aumentam as chances de detecção e remoção das lesões potencialmente malignas, diminuindo assim a taxa de mortalidade (XIE et al., 2015). Coilocitose é o indicador chave da infecção subclínica por HPV e mudanças morfológicas precoces associadas ao HPV. Ademais, podem ser empregadas como parte da rastreio do exame citopatológico para o câncer cervical (LAWSON et al., 2009).

O exame citopatológico, também conhecido como Papanicolau é o exame de triagem mais utilizado e recomendado para mulheres de 21 a 65 anos. O rastreio através deste exame pode prevenir o câncer de colo de útero, pois permite a detecção da lesão em fase pré-cancerosa e o câncer invasivo em fase precoce, aumentando a taxa de tratamento antes da evolução ao câncer invasivo. Este exame busca alterações nas células cervicais causadas pela infecção por HPV (BOUNTRIS et al., 2015).

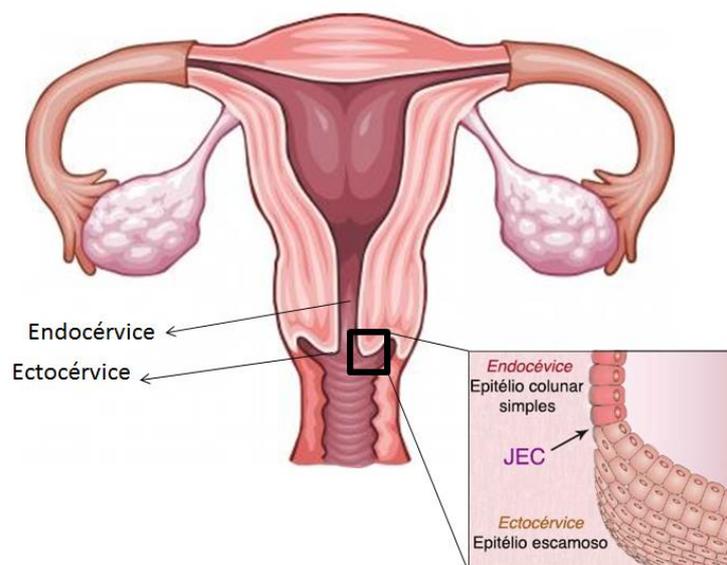
Além do exame citopatológico, outros testes para detecção do HPV são realizados sendo que um deles é o teste de DNA, que detecta o material genético do vírus nas células, podendo distingui-los pelos subtipos (America Cancer Society, 2016). Os testes e exames podem ser realizados simultaneamente como forma de rastreio (BOUNTRIS et al., 2015). Como forma de prevenção contra o vírus, o Sistema Único de Saúde (SUS) tem fornecido vacinas que protegem o organismo contra os subtipos de HPV com potencial oncogênico, que são HPV 6, 11, 16 e 18 (HERFS et al., 2012). Estudos comprovaram a alta eficiência da vacina Gardasil, que exibiu eficácia na proteção contra carcinomas cervicais, vaginais e vulvares causados por HPV (XIE et al., 2014).

2.2 Colo do útero

O colo do útero é a porção fibromuscular inferior do útero onde se encontra a abertura do órgão, localizando-se no fundo da genitália feminina. É responsável por separar os órgãos internos e externos da genitália. Possui uma forma cilíndrica e uma abertura central, conhecida como canal cervical que liga o interior do útero à cavidade vaginal (Bernardes, 2011). Sua forma e tamanho variam em cada mulher, dependendo da idade, multiparidade e estado hormonal. A porção do colo do útero exterior ao orifício cervical externo é chamado de ectocérvice. A porção próxima ao orifício cervical externo é chamado de endocérvice e é onde se encontram diversas terminações nervosas sensoriais. O canal endocervical que atravessa a endocérvice, liga a cavidade uterina com a vagina e se estende ao orifício cervical externo, onde se abre a vagina (BEHERA et al., 2005)

O colo do útero é revestido por epitélio não queratinizado estratificado escamoso e colunar. Os dois tipos de epitélio encontram-se na junção escamocolunar (JEC) (Figura 1). A maior parte da ectocérvice é revestida por um epitélio estratificado não queratinizado escamoso que contém glicogênio (BEHERA et al., 2005)

Figura 1. Endocérvice e ectocérvice. Junção escamocolunar (JEC)



A arquitetura histológica do epitélio escamoso do colo do útero é dividida em camadas e na sua parte inferior (camada basal) possui uma única camada

de células basais arredondadas com núcleos grandes e pouco citoplasma ligado à membrana basal. As células basais se dividem, se diferenciam e amadurecem para formar as próximas camadas de células que possuem citoplasma abundante e pequenos núcleos arredondados. Alguns HPVs podem persistentemente infectar essas células escamosas basais imaturas e transformá-las em células atípicas com anomalias nucleares e citoplasmáticas. A proliferação descontrolada e a expansão destas células atípicas podem levar a formação de um epitélio displásico anormal, que pode regredir para o estado normal, persistir como displasia ou progredir para câncer invasivo após alguns anos de infecção (ASCHER et al., 2003)

O canal endocervical é recoberto pelo epitélio colunar (glandular), sendo composto por uma única camada de células, a qual é mais curta em altura quando comparado ao epitélio estratificado. O epitélio colunar constitui múltiplas dobras para dentro do lúmen do canal, dando origem a projeções papilares. Forma diversas invaginações na matriz do estroma do colo do útero, resultando na formação de criptas endocervicais (glândulas cervicais) (ASCHER et al., 2003)

A junção escamocolunar (JEC) aparece como uma linha nítida devido a diferença entre a altura do epitélio estratificado escamoso e o colunar. A localização da JEC em relação ao orifício cervical externo é variável ao longo do tempo de vida da mulher, dependendo de fatores, tais como, idade, estados hormonais, trauma de parto, uso de contraceptivos orais e determinadas condições fisiológicas como a gravidez. A maioria dos cânceres cervicais surge na JEC (HERFS et al., 2012). Em estudos recentes foi descoberta uma população de células cuboidais na JEC que compartilhavam de um perfil de expressão única, desenvolvendo lesões HSIL (Herfs et al., 2013).

Em muitas mulheres a acidez vaginal (pH) ocorre durante a adolescência, o que induz a substituição da porção do epitélio colunar endocervical por um epitélio escamoso metaplásico, essa área é chamada de zona de transformação (ZT). A ZT é a região do colo uterino onde o epitélio foi substituído por um novo epitélio escamoso metaplásico. Essa região é de

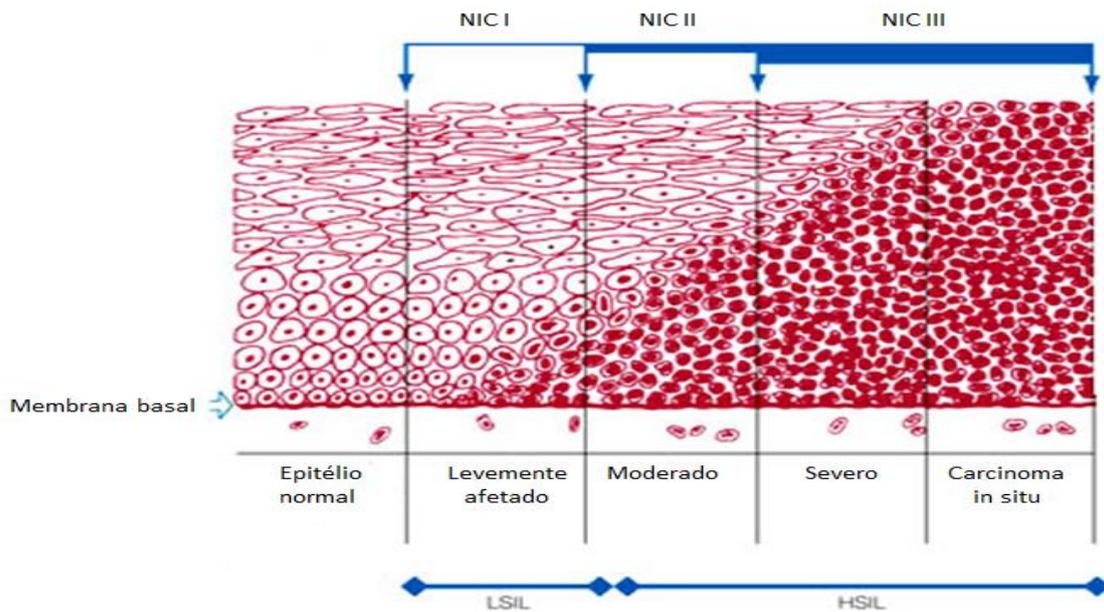
grande importância na colposcopia, visto que quase todas as manifestações de carcinogênese cervical ocorrem nessa área (HERFS et al., 2012).

2.3 Neoplasia Intraepitelial Cervical

As lesões pré-cancerosas do carcinoma cervical se manifestam mediante infecção persistente das células do colo uterino com consequentes mudanças fisiológicas graduais que poderão evoluir para o câncer. Estas lesões são denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) ou podem ser classificadas como lesão intraepitelial escamosa (SIL) ou displasia (American Cancer Society, 2016). As NICs são comuns e quase uma a cada dez mulheres terão anormalidades num exame primário (BOUNTRIS et al., 2015).

A maioria das infecções cervicais causadas por HPV regridem espontaneamente, contudo algumas persistem (MOSCICKI *et al.*, 2004) e, de acordo com o sistema de classificação Bethesda, avançam para estágios de lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL = NIC I) onde as células são ligeiramente anormais, lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL = NIC II e NIC III) (Figura 2), onde as células são severamente anormais e finalmente progridem para carcinoma *in situ*, em primeiro momento, até chegar a carcinoma escamoso invasivo (MOSCICKI *et al.*, 2004; KHENCHOUCHE *et al.*, 2013; MOODY & LAIMINS 2010).

Figura 2. Progressão da neoplasia intraepitelial cervical (NIC)



Tal classificação histológica das lesões se baseia na progressão de anormalidades fenotípicas indicativas de malignização das células epiteliais que se estende da camada basal inferior até a totalidade da espessura do epitélio escamoso, dependendo do grau de acometimento (THOMISON *et al.*, 2008). A classificação padroniza o resultado dos exames dentro dos seguintes níveis: dentro dos limites normais, células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e carcinoma (BOUNTRIS *et al.*, 2015).

Deste modo, o estágio LSIL (NIC I) corresponde à fase em que as células indiferenciadas se localizam apenas na primeira camada do tecido, o HSIL (NIC II) corresponde à fase onde as células indiferenciadas penetram na segunda e terceira camadas do tecido e o HSIL (NIC III) à etapa onde as células indiferenciadas se estendem por toda a totalidade das camadas epiteliais (MOSCICKI *et al.*, 2004).

2.4 Vírus do Papiloma Humano

Os HPVs são pequenos vírus, não envelopados, com DNA dupla fita (8kb) encapsulado em um capsídeo icosaédrico, composto por duas proteínas, uma maior e uma menor, L1 e L2 (proteínas do capsídeo), respectivamente, associados com múltiplos cânceres humanos. Como o vírus é desprovido de

um envelope, o contato celular inicial é mediado pela membrana basal das células epiteliais por ligação direta da proteína do capsídeo L1 à proteoglicanos de heparan sulfato (WARREN et al., 2014).

O vírus HPV é o patógeno mais frequentemente transmitido sexualmente e sua persistência é necessária para a progressão do câncer, visto que está associada a mais de 90% dos casos de carcinoma cervical (HERFS et al., 2012; ABDULKARIM et al., 2002). Existem 13 tipos de HPV oncogênicos de alto risco reconhecidos pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), sendo que os subtipos 16 e 18 são os mais prevalentes no câncer cervical, com taxa de infecção variando entre 60 a 90% (WALBOOMERS et al., 1999; ZHANG et al., 2005; KHENCHOUCHE et al., 2013).

Posto que estabeleçam infecções de longo prazo, os HPVs deveriam ativar as respostas imunes adaptativas e inatas do hospedeiro, entretanto evitam a própria detecção em seu ciclo de vida por meio de alguns mecanismos. Primeiro, a produção do antígeno viral é limitada à queratinócitos diferenciados da mucosa e do epitélio cutâneo. Essas células são programadas para morrer em sua diferenciação terminal, sendo assim o vírus é liberado, coincidindo com a inflamação e liberação limitada de sinais de perigo. Além disso, não há nenhuma fase de viremia do ciclo de vida do HPV, o que minimiza a ativação sistêmica de respostas imunes (WARREN et al., 2014).

Os subtipos 6 e 11 do HPV são os responsáveis pela ocorrência de verrugas, também chamadas de papilomas ou condilomas acuminados, sendo chamados de HPVs de baixo risco (BANKS et al., 1987; American Cancer Society, 2016).

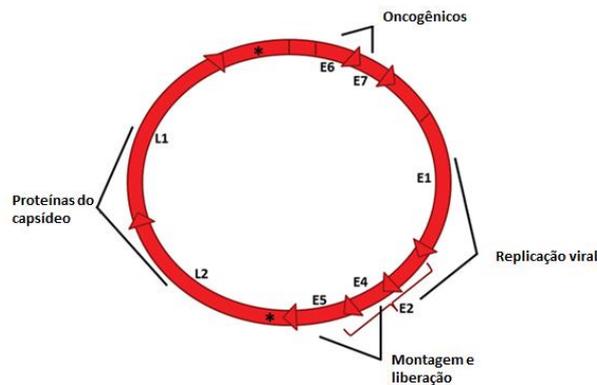
A infecção pelo HPV se inicia quando o vírus ataca os queratinócitos primários imortalizando-os e estende o tempo de vida das células epiteliais escamosas infectadas. O processo de infecção do HPV é caracterizado pela indução da transformação maligna do epitélio da mucosa cervical através da expressão dos oncogenes E6 e E7 (HERFS et al., 2012; ABDULKARIM et al., 2002).

A expressão continuada dessas oncoproteínas virais está diretamente envolvidas na regulação do crescimento do tumor (ABDULKARIM et al., 2002). Em uma infecção comum e em lesões pré-malignas, o HPV permanece na sua forma epissomal, porém em casos de carcinomas, o HPV pode permanecer na forma epissomal ou integrado ao genoma hospedeiro (SZOTEK *et al.*, 2009). Em sua forma epissomal, o vírus pode induzir o aparecimento de instabilidades genômicas durante as fases iniciais da infecção. Não se sabe muito sobre os mecanismos exatos que se sucedem para que ocorra a integração do genoma do HPV ao genoma hospedeiro, mas admite-se que a integração do HPV pode ser uma mutação dirigida na carcinogênese cervical, com consequências que influenciam os genomas do hospedeiro e do vírus (LIU et al., 2015).

Os vírus do papiloma humano de alto risco encodam uma série de proteínas, algumas com potencial oncogênico (HERFS et al., 2012). As proteínas são designadas como precoces (E1-E7) ou tardias (L1 e L2) (Figura 2). E5 e E6 agem precocemente na transformação celular, antes da integração, e são conhecidos por romper a citoqueratina causando um alargamento nuclear, que leva à aparência da coilocitose. As expressões das oncoproteínas E6 e E7 são necessárias para a conversão e manutenção do estado maligno. Elas trabalham em conjunto para romper a regulação do ciclo celular e estimular a progressão do ciclo celular. (BOUNTRIS et al., 2015; WALBOOMERS et al., 1999).

Após a integração do genoma viral no genoma do hospedeiro ocorre a ruptura da região ORF do gene E2 viral originando a perda da expressão das proteínas responsáveis pelo bloqueio da região promotora de expressão dos oncogenes E6 e E7. Isso resulta na superexpressão das oncoproteínas E6 e E7, as quais possuem um importante papel na carcinogênese cervical por suas habilidades em transformar e imortalizar queratinócitos (Figura 3) (SZOSTEK *et al.*, 2009).

Figura 3. Genoma do vírus HPV



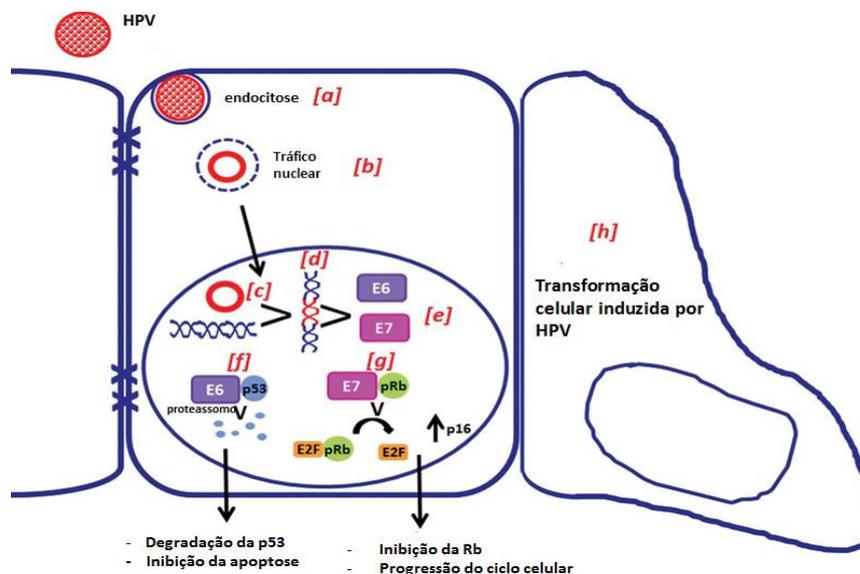
As oncoproteínas E6 e E7 se ligam e inibem os genes de supressão tumoral p53 e a pRb, respectivamente, induzindo a proliferação de células basais infectadas, que facilita a replicação do genoma viral (ZHANG et al., 2005; ABDULKARIM et al., 2002; LAWSON et al., 2009). Os supressores tumorais são responsáveis pelo controle das vias que regulam o ciclo celular e protegem a integridade do genoma. Em muitos cânceres humanos p53 e pRb são mutadas, mas no carcinoma cervical as oncoproteínas E6 e E7 se ligam ao tipo selvagem de p53 e pRb, respectivamente, neutralizando sua função (Figura 3) (Miller et al., 2012).

A oncoproteína E6 inativa a p53 conduzindo a degradação aumentada da proteína de supressão tumoral p53 via ubiquitina-proteassoma, inibindo sua função de crescimento e inibindo a morte celular (apoptose) (Sirianni et al., 2004; LAWSON et al., 2009). E6 se associa com E6AP para degradar p53 através da via proteassoma e se associa com p300 para bloquear a acetilação de p53 mediado por p300, sendo este um mecanismo regulatório crítico para controle da estabilidade e atividade transcricional de p53. A Acetilação de p53 aumenta a sua estabilidade e a atividade transcricional (XIE et al., 2014). A proteína de supressão tumoral p53 é um alvo instigante de amplo espectro para a imunoterapia tumoral devido a sua alta ocorrência em diversos tipos de carcinomas humanos (Sirianni et al., 2004)

Equitativamente, o complexo E7 se liga à proteínas do retinoblastoma (pRB), causando proteólise mediada por ubiquitina, o que resultará na diminuição dos níveis de pRb (ZHANG et al., 2005) e na ativação inapropriada do fator de transcrição E2F nas células, as quais expressarão as oncoproteínas

virais e induzirão a proliferação celular desordenada (ZUR, 2002). Ademais, a importância da função da pRb é enfatizada pelo fato que a proteína E7 pode ligar e inativar pRb, permitindo a progressão da fase S sem o estímulo mitogênico. Como consequência dessas interações, as células que expressam as oncoproteínas E6 e E7 possuirão um controle de *checkpoint* do ciclo celular desajustado e exibirão altas taxas de mutagênese (ABDULKARIM et al., 2002). Em estudo foi demonstrado que as oncoproteínas, E6 e E7, interferem nos mecanismos de duplicação cromossômica e na segregação durante a mitose, induzindo assim uma severa instabilidade cromossomal (LIU et al., 2015).

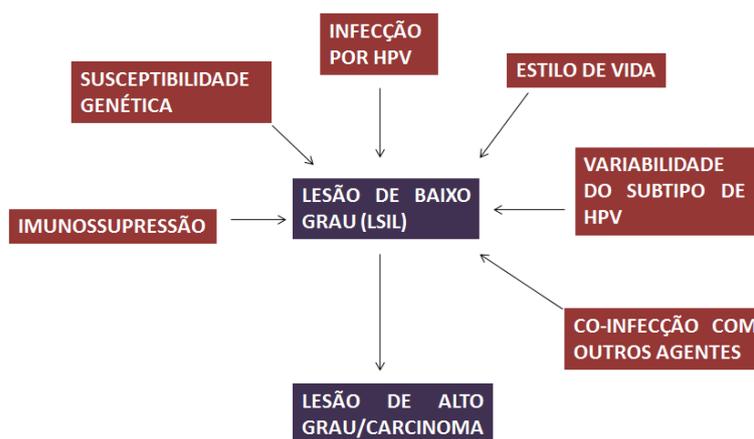
Figura 4. Integração do genoma viral ao genoma hospedeiro



2.5 Fatores de Risco para o desenvolvimento do carcinoma cervical

Embora o câncer cervical seja de origem multifatorial, a predisposição genética também possui um importante papel em seu desenvolvimento e existem vários fatores que podem contribuir para aumentar as chances de sua incidência (SINGH et al., 2008). Sabe-se que a infecção constante por HPV é o maior fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical, porém a via pela qual o vírus induz o crescimento tumoral e as mudanças genômicas que ocorrem nos tumores ainda não é bem elucidada. Além disso, existem outros fatores que podem contribuir para o desenvolvimento desta neoplasia, tais como fatores epigenéticos, genéticos, celulares e ambientais (Figura 5) (CHANG et al., 2012).

Figura 5. Fatores que contribuem para o desenvolvimento do câncer cervical



O tabagismo é um dos agentes que contribuem na progressão do câncer cervical, isso porque mulheres que fumam ficam expostas a muitas substâncias cancerígenas que são absorvidas através dos pulmões e transportadas na corrente sanguínea por todo o corpo. Acredita-se que essas substâncias

nocivas danifiquem o DNA das células da cérvix e contribuam na evolução do câncer cervical (American Cancer Society, 2016)

Fatores como imunossupressão, susceptibilidade genética, estilo de vida e a co-infecção com outros agentes podem contribuir no desenvolvimento e progressão do câncer cervical (Figura 5) (WU et al., 2013; FREITAS et al. 2012).

Baseado nestas informações é evidente que a infecção por HPV, isoladamente, não é suficiente para a conversão maligna (LENH *et al.*, 1988; SOUTHERN & HERRINGTON, 1998).

2.6 Epstein-Barr Vírus (EBV)

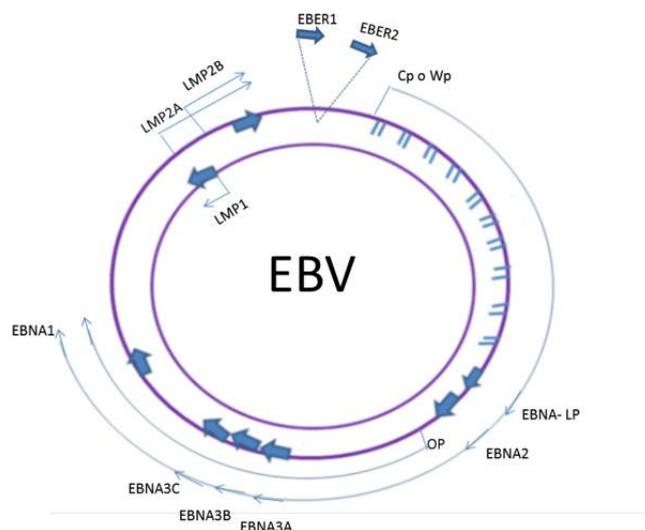
O *Epstein-Barr Vírus* é um vírus ubíquo, pertencente ao grupo dos Herpesvirus, possuindo em seu DNA cerca de 170 kb e codifica 80 genes (KIKUCHI et al., 2015). Causa infecção lítica em linfócitos B que sofreram maturação em centros germinais e em células epiteliais (KIKUCHI et al., 2015; CAMPION et al., 2014) em cerca de 90% da população no mundo (ATTAYEK et al., 2015; THOMPSON *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2010) e possui um alto potencial oncogênico (CAMPION et al., 2014). É responsável pelo desenvolvimento de diversos tipos de malignidades epiteliais e linfoides, tais como linfoma de Burkitt (BL), linfoma de Hodgkin (HL), linfoma de células T, linfoma de células B em imunodeficiência, tumores epiteliais da tireóide e do estômago, carcinoma gástrico e carcinoma nasofaríngeo (ATTAYEK et al., 2015; KIKUCHI et al., 2015; LORENZETTI et al., 2010; SZOSTEK *et al.*, 2009). Contudo o papel do EBV na transformação das malignidades humanas permanece não totalmente estabelecido, particularmente em cânceres epiteliais (TSAO et al., 2015).

Os linfócitos B infectados com EBV *in vitro* tornam-se imortalizados e são frequentemente usados como um sistema modelo para estudo da infecção pelo EBV e a tumorigênese dirigida pelo vírus (ATTAYEK et al., 2015). Estudos mostraram que a infecção latente por EBV tem sido um cofator carcinogênico em várias neoplasias malignas de origem epitelial (THOMPSON *et al.*, 2010). Além disso, em pesquisas recentes foi visto que o EBV pode ter um papel de

cooperação no desenvolvimento carcinogênico por favorecer a integração do HPV16 no genoma celular (KAHLA *et al.*, 2012). Devido ao grande número de malignidades recorrentes da infecção pelo EBV, a organização mundial de Saúde (WHO) classificou o EBV como um agente carcinogênico em 1997 (LORENZETTI *et al.*, 2010).

O estabelecimento da infecção latente por EBV em células epiteliais pré-malignas pode representar um passo essencial no desenvolvimento inicial de malignidades epiteliais (TSANG *et al.*, 2015). A infecção em células epiteliais exibe um processo de expressão diferente quando comparado às células B, pois alguns genes que possuem um papel essencial na imortalização de células B não são expressos em células epiteliais, apenas um grupo mais restrito de genes latentes como EBNA1, LMP-1 e LMP2A (Figura 6) (TSAO *et al.*, 2015). Todos os herpesvírus exibem duas fases em seu ciclo de vida que juntos descrevem uma infecção persistente, os quais são latência e replicação lítica. Em tumores associados ao EBV, o vírus estabelece uma infecção latente, que é caracterizada pela expressão limitada de um subconjunto de genes virais latentes. Ademais, em malignidades epiteliais associadas com EBV, as propriedades indiferenciadas de células epiteliais podem ser um pré-requisito para o estabelecimento da infecção latente por EBV e a ativação do ciclo lítico viral pode ser induzida pela diferenciação celular (TSANG *et al.*, 2015).

Figura 6. Organização do genoma do EBV



Após a infecção inicial e a estabelecimento da resposta imune, os vírus entram em um estado latente e persistem com as células hospedeiras sem causar danos claros ao hospedeiro. Há pelo menos 4 diferentes formas de latência, cada uma associada com a expressão de diferentes padrões dos genes virais e ligados à vários linfomas e desordens linfoproliferativas (ATTAYEK et al., 2015).

Apenas o antígeno nuclear 1 (EBNA1) codificado pelo EBV é essencial para a persistência e auto-replicação do genoma viral e é consistentemente expresso em todos os tipos de latência (KIKUCHI et al. 2015). Os cânceres associados com a infecção pelo EBV variam na prevalência viral e no padrão de expressão do gene latente sugerindo que o EBV pode afetar a proliferação celular em várias vias (LORENZETTI et al., 2010). EBNA1 é uma proteína latente importante que é requerida para a persistência do genoma do EBV em todas as malignidades associadas. (TSANG et al., 2015). Ela governa a replicação e a segregação mitótica dos episômos EBV para manter um número estável de genoma viral em células filhas após a divisão celular. Em células epiteliais, possui o papel de promover a sobrevivência celular sobre os danos do DNA e induz instabilidade genética (TSANG et al., 2015). Essa proteína também pode promover a oncogênese por modular várias vias de sinalização, incluindo o acúmulo de complexo NF- κ B (TSAO et al., 2015). Essa proteína afeta múltiplas vias celulares, incluindo a proliferação celular, invasão, sobrevivência e reparo de DNA (TSANG et al., 2015).

Durante a infecção latente, o genoma EBV encontra-se como multicópias episomais que expressam apenas genes envolvidos na sobrevivência e persistência do vírus na célula. Em muitos tumores associados com EBV, o genoma viral é mantido através da expressão constante do antígeno EBNA1 do EBV. O EBNA-1 se liga à seqüência oriP (origem de replicação do DNA viral) no DNA do EBV permitindo que o genoma do vírus se mantenha de forma episomal em células B transformadas e para garantir a segregação durante a divisão celular (TSANG et al., 2015; THOMPSON *et al.*, 2010).

A proteína LMP-1 é conhecida por ser um oncogene essencial para a imortalização de células B, desenvolvendo linfoma nas células B de

camundongos (KIKUCHI et al., 2015). Também exerce múltiplas propriedades oncogênicas e tem um potencial de transformação em células epiteliais por ativar vias múltiplas de sinalização e modular a expressão de vários oncogenes e genes supressores tumorais (TSANG et al., 2015; DAWSON et al., 2012). LMP1 é detectada em lesões pré-malignas e é especialmente concentrada nas camadas basais, implicando na sua participação em estágios iniciais do tumor (TSAO et al., 2015). Além disso, essa proteína pode induzir a secreção de MMPs e suprimir a expressão de TIMPs para facilitar a degradação da matriz extracelular para invasão ou metástase no desenvolvimento de carcinoma de nasofaríngeal (TSANG et al., 2015)

A hipótese de replicação do EBV no epitélio cervical e seu possível papel no carcinoma do colo do útero têm sido levantados. Além disso, a presença de EBV no tecido do câncer cervical sugere o possível envolvimento na progressão do câncer cervical (GAUR *et al.* 2014).

2.7 Matrix extracelular (MEC)

O microambiente tumoral possui um papel importante no processo de progressão tumoral (SZKARADKIEWICZ *et al.*, 2014). As células tumorais criam um nicho favorável para o seu desenvolvimento, modificando diretamente o microambiente e recrutando células estromais locais para desenvolver essa alteração (BOUDREAU *et al.*, 2012). No epitélio normal, células parênquimais e componentes estromais são fisicamente separados por uma membrana basal. A transição do epitélio normal para o carcinoma invasivo é precedido pela ativação do estroma do hospedeiro local. A invasão ocorre em cooperação com as células estromais e o epitélio transformado. A progressão maligna prejudica a integridade da membrana basal resultando na deterioração dessa estrutura organizada. Células tumorais invasivas perdem suas características epiteliais e adquirem um fenótipo metastático (FULLÁR et al., 2015).

Um componente importante envolvido com o microambiente tumoral é a matriz extracelular. O processo de tumorigênese e metástase envolve a migração de células do câncer e a penetração através da matriz extracelular (MEC). A MEC divide-se em membrana basal (MB), matriz conjuntiva e matriz

sanguínea. É uma estrutura que fornece o suporte da arquitetura celular e da organização do tecido. Não é uma estrutura estática e pode ser regularmente remodelada pelas células presentes em seu interior e ao seu redor (HYNES *et al.*, 2012).

As fibras colágenas e elásticas, os proteoglicanos e as glicoproteínas são as principais proteínas da matriz extracelular. As interações das células com a MEC são essenciais para o normal desenvolvimento e funcionamento do organismo. Os principais componentes responsáveis pelo controle dessa atividade são as metaloproteinases (MMPs), os inibidores de metaloproteinases (TIMPs) e os fatores de crescimento (JOHNSON *et al.*, 2004).

As proteínas da MEC que compõem a especializada membrana basal (MB) servem como barreira para a invasão celular. Contudo, a membrana basal é rica em laminina e colágeno IV e também fornece o substrato para a adesão e migração das células tumorais migratórias. Ademais, a degradação da MB resulta na liberação e ativação de vários fatores de crescimento requeridos na angiogênese, crescimento tumoral e metástase (JACOB & PREKERIS, 2015; YURCHENCO, 2011)

Estudos em câncer do colo uterino descrevem a degradação da matriz extracelular (MEC), mediada pela ação das MMPs 2 e 9, no processo de invasão, metástase e recorrência de tumores(JACOB & PREKERIS, 2015).

2.8 Metaloproteinases de matriz

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são o maior grupo de enzimas proteolíticas (endopeptidases) zinco-dependentes (McGUIRE *et al.*, 2012; XIE *et al.*, 2015; JACOB & PREKERIS, 2015), constituído de no mínimo 28 MMPs bem caracterizadas ligadas à membrana (SICA *et al.*, 2014). São altamente conservadas e estruturalmente relacionadas, com habilidades tais como, degradar todos os componentes da matriz extracelular, regeneração tecidual em gestação, cicatrização de feridas, angiogênese e regulação de vários comportamentos celulares (OMAR *et al.*, 2015; XIE *et al.*, 2015). A ruptura da

membrana basal envolve uma localizada degradação da MEC via secreção de MMPs (JACOB & PREKERIS, 2015; HIRASHITA *et al.*, 2012).

As MMPs humanas são divididas em categorias que dependem da especificidade do substrato (JACOB & PREKERIS, 2015), incluindo as colagenases (MMP1, 8 e 13), as gelatinases (MMP2 e 9) estromelinas (MMP3, 10 e 11), matrilisinas (MMP7), MMPs tipo membrana dentre outras. (HENG *et al.*, 2012).

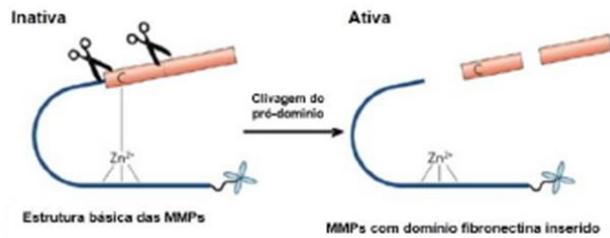
Há uma ampla evidência do papel das MMPs em processos normais (JACOB & PREKERIS, 2015) e patológicos (FINGLETON *et al.*, 2007), incluindo embriogênese, cicatrização de feridas, inflamação, artrite, doenças autoimunes e arterosclerose (DAVIDSON *et al.*, 2014). São conhecidas por terem efeitos pró e anti-tumorigênico nos tumores, por processar vários substratos bioativos que não são da MEC, tais como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas e podem também mediar respostas inflamatórias e imunes para células cancerígenas (OMAR *et al.*, 2015).

Dentre os processos patológicos, sua ação apresenta-se de forma imediata na invasão do câncer em torno da MEC e na penetração dos vasos sanguíneos e linfáticos, contribuindo para a metástase dos tumores (JACOB & PREKERIS, 2015; MYLONA *et al.*, 2005). Para obter um fenótipo invasivo, células do carcinoma cervical podem utilizar MMPs estromais (FULLÁR *et al.*, 2015).

A regulação da atividade proteolítica dessas endopeptidases ocorre via dois mecanismos principais, sendo eles: a ativação da forma precursora (zimogênio) e a inibição da sua atividade enzimática por inibidores de tecido de metaloproteinases (TIMPs) (JACOB & PREKKERI, 2015; HENG *et al.*, 2012).

A maioria das MMPs são secretadas na forma inativa como uma pró-enzima e são ativadas extracelularmente (Figura 7) (ADACHI *et al.*, 1999). Além disso possuem a capacidade de se ativarem mutuamente (SINGH *et al.*, 2008; SOUZA, 2002).

Figura 7. Ativação de uma pró-enzima através da clivagem do pré-domínio



Existem 4 TIMPs encodados no genoma humano (TIMP 1 a 4) com variâncias específicas para inibição de MMPs. Os TIMPs 1 e 2 inibem a maioria das MMPs . Ademais, são capazes de regular a atividade proteolítica das MMPs através da ligação de um íon zinco em seu sítio catalítico (JACOB & PREKERI, 2015).

As MMPs podem mudar o microambiente tumoral promovendo a degradação da matriz extracelular e membrana basal, resultando na proliferação de células tumorais, inibição da apoptose e aumento da vasopermeabilidade, levando a migração de células tumorais. (WU et al., 2011). Na tumorigênese, seu envolvimento ocorre nas fases de iniciação e principalmente em estágios tardios, tais como progressão, invasão e metástase (XIE et al., 2015; SICA et al., 2014).

A associação das MMPs com a metástase e o câncer tem levantado considerável interesse porque elas representam um alvo atrativo para o desenvolvimento de novas drogas antimetastáticas. Deste modo, o entendimento da estrutura e função dessas enzimas chaves tem importantes implicações para a terapia antitumoral (XIE et al., 2015).

A expressão de MMP-7 e MMP-9 podem ser induzidas em células de câncer, aumentadas pela interação de células estromais do tumor. A análise de sua expressão revelou uma correlação com a quantidade de hialurona (HA), receptor CD44 notado em baixos graus em carcinomas de células escamosas (FULLÁR et al., 2015)

2.9 Matrilisina (MMP-7)

A metaloproteinase de matriz 7, também chamada de matrilisina está codada no gene localizado no cromossomo 11q21-q22 (SINGH et al., 2008). É expressa predominantemente no epitélio de vários órgãos dentro das condições fisiológicas e pode ser superexpressa em uma variedade de cânceres, tais como câncer colorretal, de esôfago, de estômago, de rim e de mama. (WU et al., 2012)

A MMP-7 é o menor membro da família das MMPs descritas, com apenas 26 kDa (Figura 8) (DAVIDSON et al., 2015), sendo a única que, estruturalmente, não contém os cinco domínios básicos como a maioria das MMPs, apenas os domínios que são responsáveis para a secreção e atividade enzimática. Sua expressão é aumentada em tecido infectado e em vários cânceres, ao contrário de outras MMPs (MYLONA et al., 2005; OMAR et al., 2015; McGUIRE et al., 2012; WU et al., 2011).

Figura 8. Estrutura da matrilisina (MMP-7)



É uma protease com ampla especificidade de substrato, capaz de degradar elastina, proteoglicanos, fibronectina e colágeno tipo IV (HENG et al., 2012), sendo este último o principal constituinte da membrana basal, uma das primeiras barreiras que as células cancerígenas precisam atravessar para que ocorra a metástase (JACOB & PREKERIS, 2015). Além disso, pode clivar substratos da superfície celular, incluindo E-caderina, fator α , fator de necrose tumoral e ligante Fas, os quais são chamados de 'shedase', pois possuem um importante papel na transdução de sinal, adesão célula-célula e apoptose. A MMP-7 é de origem epitelial e pode ser detectada em epitélios normais de órgãos glandulares específicos (WU et al., 2011).

Ela é capaz de ativar outras pró-MMPs, como MMP-2, -8 e -9, além de clivar e liberar outras importantes moléculas bioativas (Kumar et al., 2005). De todas as MMPs, a MMP-7 pode ter papel crucial no desenvolvimento da carcinogênese, pois sua ação é associada às propriedades celulares de adesão de membrana e está envolvida na degradação da matriz extracelular, modulando o microambiente tumoral e promovendo o processo de invasão e

metástase (SICA et al., 2014). Em estudo, a expressão constitutiva de MMP-7 foi observada em células neoplásicas e não neoplásicas no tecido de mama humano, indicando assim que as suas funções não estão meramente relacionadas ao remodelamento da MEC (MYLONA et al., 2005).

Em vários tipos de câncer, uma correlação positiva entre a MMP-7 e o potencial invasivo tem sido documentada. Sua superexpressão é predominantemente associada com células epiteliais pré-malignas (SINGH et al., 2008). Ademais, a MMP-7 tem sido detectada em estágios precoces do câncer do colon, implicando na destruição da matriz extracelular e no desenvolvimento e progressão da metástase neste câncer (WU et al., 2011).

A presença do HPV-16 tem sido relacionada ao aumento de expressão de MMP 2, 9, T1-MMP e TIMP-2, bem como aumento de atividade de pró-MMP-2, em cultura de células de neoplasia cervical, sugerindo o envolvimento do HPV na regulação de expressão de MMPs e TIMP-2 (SICA et al., 2014).

Além disso, a MMP7 já foi identificada como marcadora da população de células cuboide da junção escamo-colunar da cérvix, mais susceptíveis a infecção pelo HPV (HERFS *et al.*, 2012). Em estudo recente foi demonstrado que a MMP-7 não é expressa em células diferenciadas normais do epitélio do colorretal, contudo é encontrada em altos níveis em células de câncer do colo retal, sendo dessa forma um possível biomarcador para predição dessa doença em pacientes que apresentem o quadro de câncer do colo retal (SICA et al., 2014). A sua importância é realçada por dados clínicos que mostraram existência de associação entre a expressão de MMP-7 e o decréscimo na sobrevivência de pacientes com câncer do colo uterino (MIYATA *et al.*, 2006).

Considerando-se as implicações da MMP-7 como um ativador local de proteinases e de outras proteínas biologicamente ativas, sugere-se que a inibição específica da MMP-7 poderia contribuir na inibição de carcinogênese.

3. *JUSTIFICATIVA*

3.JUSTIFICATIVA DA ANÁLISE HISTOLÓGICA DE LESÕES DO COLO UTERINO

Embora sejam numerosos os estudos comprovando a importância do HPV no surgimento e desenvolvimento do câncer cervical, é evidente que a infecção por esse vírus não é suficiente para que ocorra uma conversão maligna das lesões, sendo necessário, portanto o auxílio de outros agentes etiológicos para tal desenvolvimento. Com este estudo pretendeu-se aprofundar o conhecimento sobre as reais causas do desenvolvimento do câncer de colo uterino através da identificação de outros fatores além do HPV.

Portanto, é de fundamental importância estabelecer a relação entre a co-infecção HPV / EBV, a expressão da MMP7 e a transformação para o fenótipo maligno do carcinoma invasor. Para tal, propõe-se correlacionar o padrão de expressão da MMP7 com a presença dos subtipos de HPV (16 e 18) e EBV a partir de biópsia de lesões cervicais de diferentes graus de transformações neoplásicas intraepiteliais NICs, sendo estes: dentro dos limites de normalidade X intraepiteliais de baixo grau (NIC I) X intraepiteliais de alto grau (NIC II e NIC III).

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- A) Analisar a correlação da co-infecção dos subtipos de HPV (16/18) com EBV e o padrão de expressão da MMP-7 a partir de biópsia de lesões cervicais de diferentes graus de transformação neoplásica (dentro dos limites de normalidade x LSIL x HSIL).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Associação do EBV, do HPV e da MMP-7 nas sucessivas fases do processo de carcinoma do colo uterino por imunolocalização tecidual.
- B) Possível associação entre a proteína MMP-7 e os diferentes padrões de infecção pelo HPV/EBV em relação aos estágios pré-malignos do carcinoma cervical

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1 Indivíduos

O estudo se desenvolveu através da análise retrospectiva dos preparados histopatológicos de espécimes teciduais do colo uterino de pacientes selecionadas sem critérios previamente definidos.

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Bioanálise Clínica, Citohistológica e Molecular e Laboratório de Imunologia Aplicada localizados na Universidade Federal de São Carlos/UFSCar em colaboração com o Dr. André

Luiz Malavasi, líder do centro de estudo e pesquisa do Hospital Pérola, Centro de Referência da Saúde da Mulher em São Paulo.

Foram analisadas biópsias emblocadas em parafina de pacientes do Hospital Pérola Byington, cujas amostras possuíam mais do que cinco anos de coleta. Dessa forma, foi relacionado um total de 93 blocos concernentes a 93 pacientes, todos com número de registro referentes aos exames anatomopatológicos das respectivas pacientes.

A totalidade dos blocos de parafina referentes aos casos foi solicitada ao Departamento de Patologia do Hospital Pérola Byington, porém de 33 blocos não foi possível realizar secções devido às condições pelas quais os blocos se encontravam, tais como parafina antiga, tecido muito rijo e cortes da biópsia muito grandes. Sendo assim, 33 casos foram excluídos das análises.

O cortes foram seccionados a partir da biópsia de tecido emblocado de colo uterino embebido em parafina fixado em formol coletados de 60 pacientes do sexo feminino, com idades entre 20 e 70 anos (média de 45 anos), com diferentes lesões cervicais, provenientes dos arquivos da Anatomia Patológica do Hospital Pérola Byington, Centro de Referência da Saúde da Mulher (SP) que tinham mais de 5 anos de realização. Foram seguidas as orientações do conselho de revisão institucional, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Carlos (44511015.0.0000.5504).

5.2 Morfologia

As amostras foram submetidas à procedimentos histológicos. Os casos foram avaliados por patologista especializada. Os diagnósticos foram estabelecidos por avaliação morfológica através da coloração hematoxilina-eosina dos blocos, em combinação com IHC utilizando os anticorpos aplicados, conforme Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Relação de anticorpos utilizados

Anticorpo	Diluição	Descrição
-----------	----------	-----------

Anti MMP-7	1:100	Abcam, Cambridge, EUA – nº produto ab3205
Anti HPV16 E6 + HPV18 E6	1:60	Abcam, Cambridge, EUA – nº produto ab70
Anti EBV Nuclear	1:200	Abcam, Cambridge, EUA – nº produto ab8329

As amostras de biópsias do colo uterino parafinadas, previamente fixadas em formol a 10% e incluídas em parafina, foram cortadas na espessura de 4 µm, estendidas sobre lâminas de vidro, desparafinizadas, hidratadas, coradas pela técnica de Hematoxilina/Eosina (HE) e, então, re-examinadas em microscopia de luz para confirmação do diagnóstico anátomo-patológico.

Foram considerados representativos os cortes histológicos que continham ao menos um compartimento do epitélio estratificado escamoso e um do epitélio colunar, sendo que na maioria dos casos foi possível apenas um diagnóstico descritivo, ressaltando as principais características das lesões, quando presentes.

O estadiamento das lesões foi avaliado, caso a caso, de acordo com a análise do acometimento do epitélio, realizada sob microscópio e foram divididos em quatro classes representadas de acordo com o grau da lesão, conforme está na Tabela 5.2.

Procedeu-se uma minuciosa análise das amostras em cada caso e cada preparado histopatológico foi semiquantificado segundo um sistema de escores variando de 0 a +++ de acordo com a intensidade e extensão do acometimento do epitélio (HERFS et al., 2013)

0: ausência de alteração no epitélio

+: 0 a 33% de alteração no epitélio (um terço de acometimento)

++: 34 a 67% de alteração no epitélio (dois terços de acometimento)

+++ : 68 a 100% de alteração no epitélio (todo o epitélio alterado)

Tabela 5.2. Distribuição das amostras de acordo com o grau de lesão

Controle	Dentro dos limites de normalidade ou alteração celular benigna
NIC I	Lesão Intraepitelial de baixo grau (LSIL)
NIC II	Lesão Intraepitelial de alto grau (HSIL)
NIC III	Lesão Intraepitelial de alto grau (HSIL)

5.3 Imunohistoquímica:

Os ensaios da imunohistoquímica foram realizados com os blocos de parafina contendo as amostras de tecido e o método utilizado foi o indireto de estreptoavidina peroxidase.

Para permitir a análise dos tecidos ao microscópio de luz, eles foram seccionados em fatias bem finas e uniformes de 4µm. A microtomia teve início com a fixação do bloco de parafina no micrótomo de tal forma que a superfície do bloco ficasse paralela à navalha e então foi efetuado o corte. Estes foram distendidos sobre a superfície da água evitando-se a formação de 'pregas'. Os cortes foram coletados com lâminas silanizadas (StarFrost, Knittel Glaser, Alemanha). Posteriormente foram realizados os passos para desparafinização utilizando xilol, hidratação sob sequências alcoólicas em concentrações decrescentes até água destilada. Em seguida, as lâminas foram transferidas para uma placa aquecida e na sequência para uma estufa à 60° C por 1h para a retirada do excesso de parafina e aumento da adesão do corte à lâmina.

As lâminas foram então lavadas em PBS e submetidas ao protocolo de recuperação antigênica através do tratamento com o tampão citrato 0,01 M, pH 6,0, aquecido na intensidade máxima do micro-ondas 1.300 W (95°C) por 10 min, e o tampão anidro citracônico (pH 7,4) também aquecido no micro-ondas na mesma intensidade e tempo, seguido pelo resfriamento em temperatura ambiente por um período de 50 a 60 min. As lâminas foram secas ao redor dos cortes e lavadas com PBS por 3 vezes. Em seguida foi realizado o bloqueio de ligações não específicas de anticorpo com uma solução de PBS 1x (0,1M),

contendo 1% de BSA (albumina de soro bovino) para bloquear reações não específicas. Após lavagem, os cortes foram incubados a 4°C em recipiente com umidade saturada por um período de 16 horas (*overnight*), com os anticorpos monoclonais primários apropriados diluídos. Em seguida a solução de peróxido de hidrogênio (3%) (H₂O₂) foi depositada na lâmina por 20 min. para bloqueio da atividade da peroxidase endógena, seguida pela lavagem em PBS (3x). Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado (Abcam, Cambridge, EUA – nº produto ab97033), diluído a 1:200 por 45 minutos a temperatura ambiente, seguida de uma nova lavagem com PBS (3x). As lâminas foram então incubadas com o complexo estreptavidina-peroxidase (Sigma, nº produto S 2438 Saint Louis, Missouri) na diluição de 1:100, por um período de 45 min. em temperatura ambiente. Por fim, a marcação foi revelada utilizando-se a solução cromógena composta por substrato de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 1% e 0,5 mg do composto DAB (3,3'-diaminobenzidina – Sigma Co-USA-D5637) (MYLONA et al., 2005) por 8 minutos a temperatura ambiente (KIKUCHI et al., 2015). As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris e montadas com as lamínulas utilizando Permount® (Fisher Scientific NJ USA) (DAVISDON et al., 2015). As condições padrão utilizadas para os testes de imuno-histoquímica foram estabelecidos preliminarmente.

Anticorpos monoclonais foram utilizados contra o domínio catalítico da matrilisina (MMP-7) humana (SURENDRAN et al., 2004). As amostras das lâminas foram imunohistoquimicamente analisadas pela expressão da MMP-7 usando os anticorpos, aplicados numa diluição de 1:100 (DAVISDON et al., 2015). Para controle negativo de marcação da MMP-7 foi utilizado o isotipo controle monoclonal, o IgG1 (Abcam, Cambridge, EUA – nº produto ab18443) (Khenchouche et al., 2013). Controle positivo consistia de uma amostra de carcinoma de mama que demonstrou imunorreatividade para a MMP-7 em um estudo piloto.

O anti-MMP7 é um anticorpo monoclonal produzido em camundongo que reconhece as formas latentes e ativas da proteína humana MMP-7. Anti-HPV16 E6 + HPV18 E6 antibody é também um anticorpo monoclonal produzido por camundongos, que identifica a expressão da proteína E6 em células

transformadas pelo vírus HPV. O anti-EBV Nuclear Antigen antibody, assim como os demais utilizados é um anticorpo monoclonal produzido em camundongos, com especificidade para o antígeno nuclear EB do vírus *Epstein-Barr* (EBNA1), o qual é um dos antígenos que é expresso em todas as malignidades associadas com EBV.

5.4 Análise histomorfométrica

O padrão de expressão imunohistoquímica HPV 16/ 18, EBV e MMP7 foi analisado utilizando-se a microscopia óptica e a morfometria computadorizada. Para a análise morfométrica, a imagem do corte histológico foi digitalizada utilizando-se escaner de lâmina (3D HISTECH, Budapest, Hungria) carregado com objetiva de 40x. As áreas de interesse nas imagens digitalizadas marcadas pela imunohistoquímica foram selecionadas de acordo com a saturação e intensidade da imunomarcação. A porcentagem de área ocupada pelas regiões de interesse foram semiquantificadas. Para a análise da expressão imunohistoquímica da MMP-7, o padrão de expressão foi analisado por meio dos seguintes parâmetros: distribuição, área, intensidade e padrão de imunorreatividade. Para o parâmetro intensidade, os casos foram categorizados em imunorreatividade positiva intensa (+++), imunorreatividade positiva moderada (++) , imunorreatividade fraca (+) e negativa (0). O critério de positividade utilizado para o HPV foi a identificação de núcleos de queratinócitos superficiais fortemente corados (LAWSON et al., 2009). O critério de positividade para EBV foi a identificação de imunopositividade para a proteína LMP nuclear e/ou citoplasmática nos queratinócitos ao longo de toda a espessura epitelial (SOUZA, 2011).

5.5 Análise Estatística

Os parâmetros de expressão da proteína MMP-7 foram relacionados com a presença de HPV / EBV e com o grau das lesões (normal, NIC I, NIC II e NIC III) usando os testes estatísticos Qui-quadrado/Exato de Fisher e de correlação de Spearman, em função dos tipos de variáveis que foram

comparadas. Para todas as análises foram considerados significativos os valores $p < 0,05$ (LÓPEZ *et al.*, 2012)

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Análise da Imunohistoquímica

As amostras foram divididas em controle, NIC I (LSIL), NIC II e NIC III (HSIL) refletindo seu risco de progressão maligna. A análise foi realizada em diferentes seções do epitélio e do tecido, sendo estes, endocérvice do epitélio, JEC do epitélio, ectocérvice do epitélio, endocérvice do tecido conjuntivo, JEC

do tecido conjuntivo, ectocérvice do tecido conjuntivo e também as glândulas presentes no tecido como apresentadas nas Figuras abaixo.

Uma avaliação semiquantitativa da imunorreatividade da MMP-7, presença de HPV e EBV foi realizada por um mesmo observador, em ensaio cego, de acordo com a porcentagem de células positivas e a distribuição da coloração. Como controle positivo foram utilizados secções de mama humana previamente conhecidos por serem altamente reativos.

A imunomarcação da MMP-7 foi baseada na coloração dos núcleos das células, sendo classificadas como (0), (+), (++) , (+++)

Para os vírus, a imunomarcação foi baseada na positividade ou negatividade.

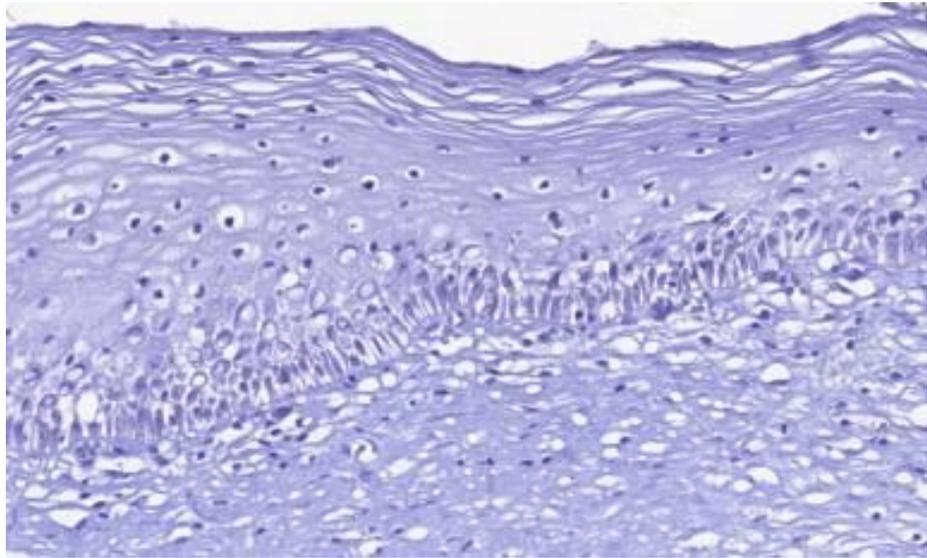
Os blocos foram divididos em grupos de acordo com o padrão de coloração e intensidade, sendo eles negativo (0), células positivas dispersas (+), coloração forte, mas descontínua ou limitada à camada basal ou dois terços marcados (++) , coloração forte difusa, uniforme da camada basal até a superfície da camada epitelial basal (+++). Além disso, a imunorreatividade foi correlacionada com o estágio dos casos, sendo eles controle, NIC I, NIC II e NIC III.

A imunohistoquímica para a MMP-7 foi realizada em 60 casos e a porcentagem de sua imunorreatividade foi calculada para cada grupo.

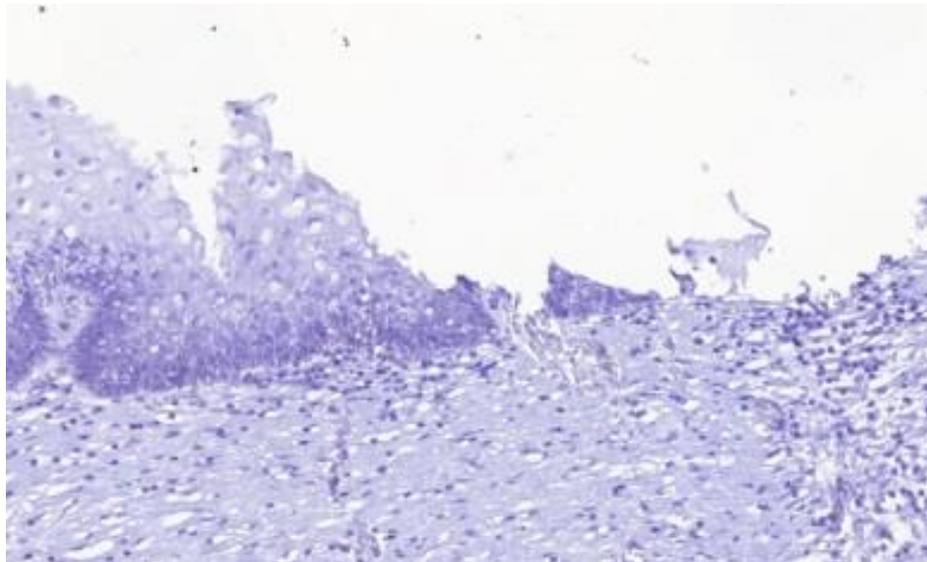
6.2 Análise das imagens da imunorreatividade da MMP-7

Na Figura 6.1 podemos observar que a imunorreatividade da proteína MMP-7 nos cortes histológicos em amostras controle foi nula e isso ocorre devido à baixa expressão dessa proteína nos tecidos normais. As imagens estão divididas relativas à porções do epitélio do colo do útero. Sendo assim, a imagem (a) representa a endocérvice, (b) representa a junção escamocolumnar, (c) representa a ectocérvice e (d) representa o tecido glandular presente no tecido do colo uterino.

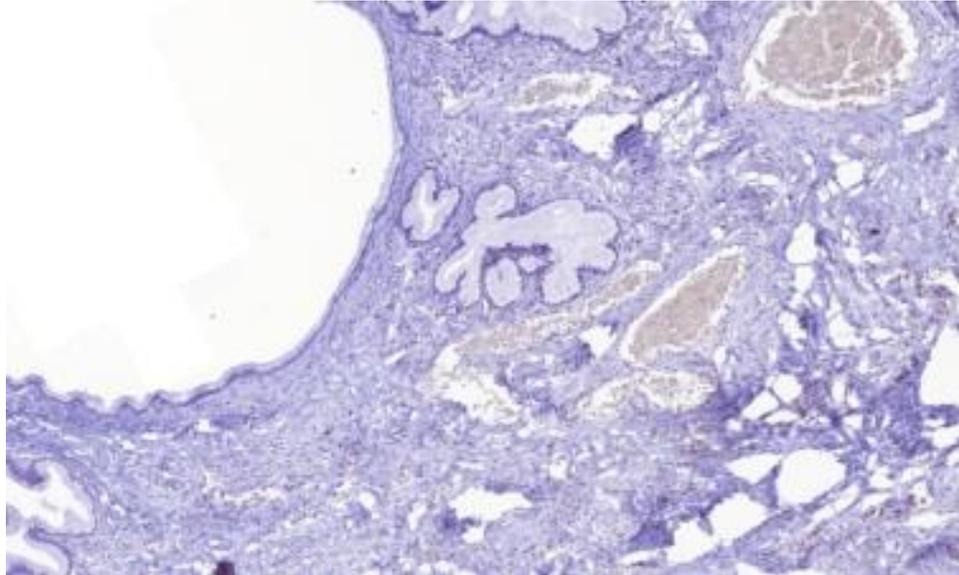
Figura 6.1. Grupo controle. Imunomarcção das porções das amostras Controle (0% de imunomarcção) a) Epitélio estratificado (endocérvice) e tecido conjuntivo b) JEC e tecido conjuntivo c) Epitélio colunar e tecido conjuntivo d) Glândulas



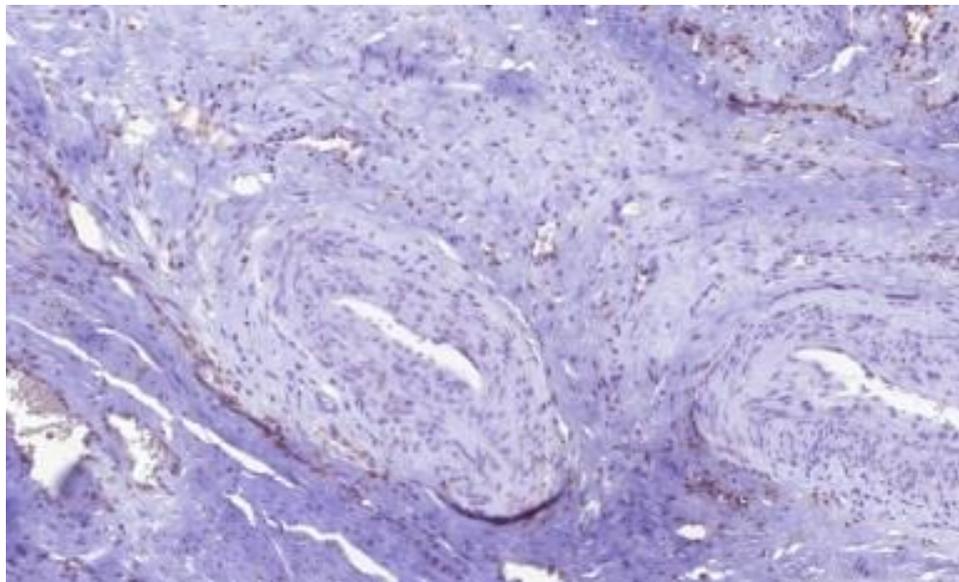
a)



b)



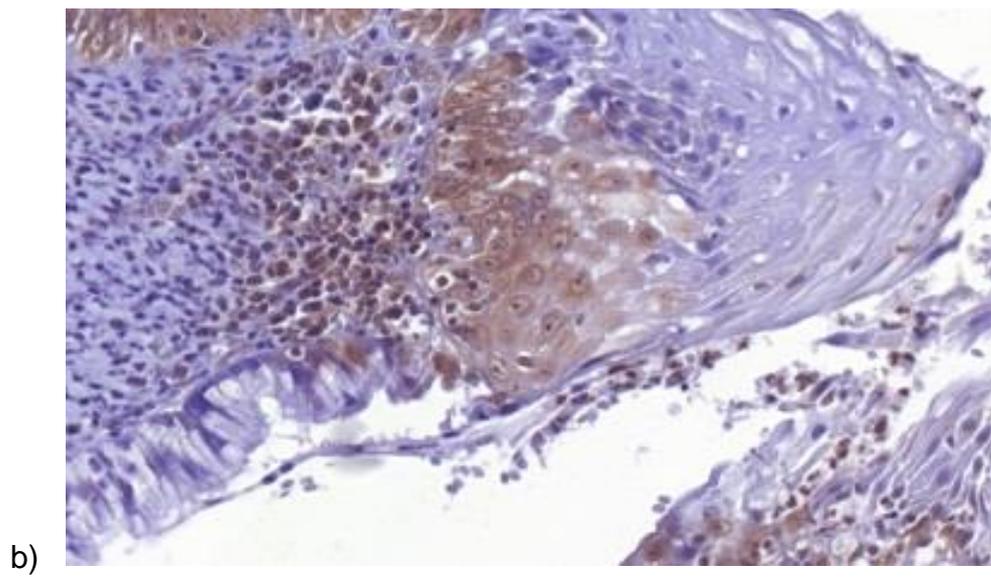
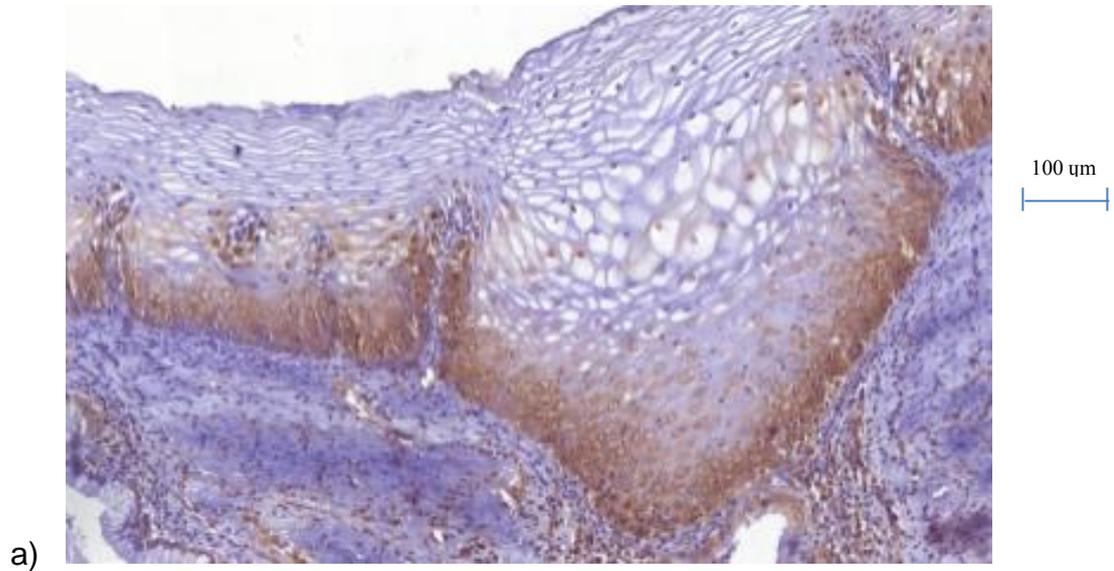
c)



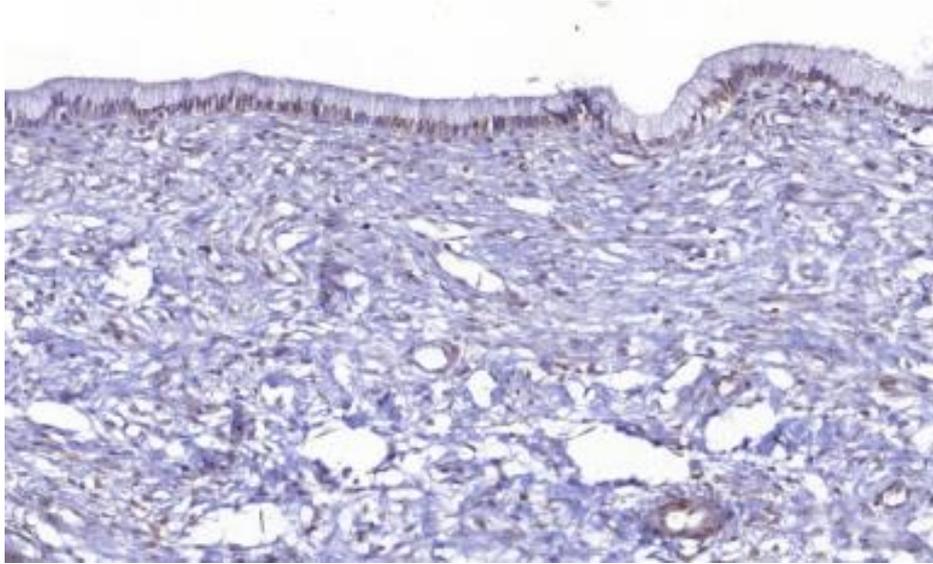
d)

Nas amostras com lesão de grau I (LSIL), podemos observar que houve a ocorrência fraca de imunorreatividade da MMP-7 na camada basal do epitélio estratificado escamoso (endocérvice), assim como no tecido conjuntivo e nas glândulas, como apresentando pela Figura 6.2. As imagens estão divididas relativas à porções do epitélio do colo do útero. Sendo assim, a imagem (a) representa a endocérvice, (b) representa a junção escamocolunar, (c) representa a ectocérvice e (d) representa o tecido glandular presente no tecido do colo uterino.

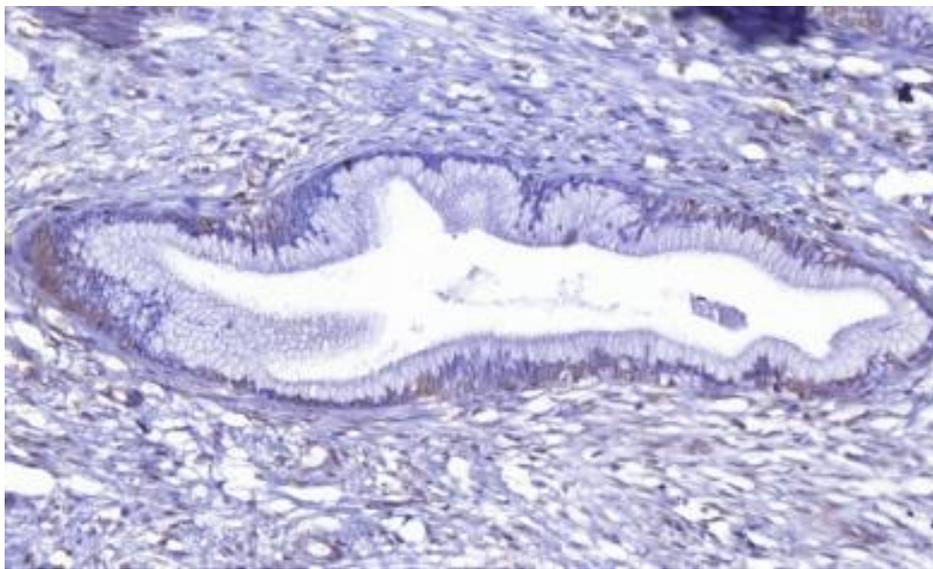
Figura 6.2 Grupo NIC I. Imunomarcção das porções das amostras lesionadas com grau I de neoplasia (30% de imunomarcção) a) Epitélio estratificado (endocérvice) e tecido conjuntivo b) JEC e tecido conjuntivo c) Epitélio colunar e tecido conjuntivo d) e e) Glândulas



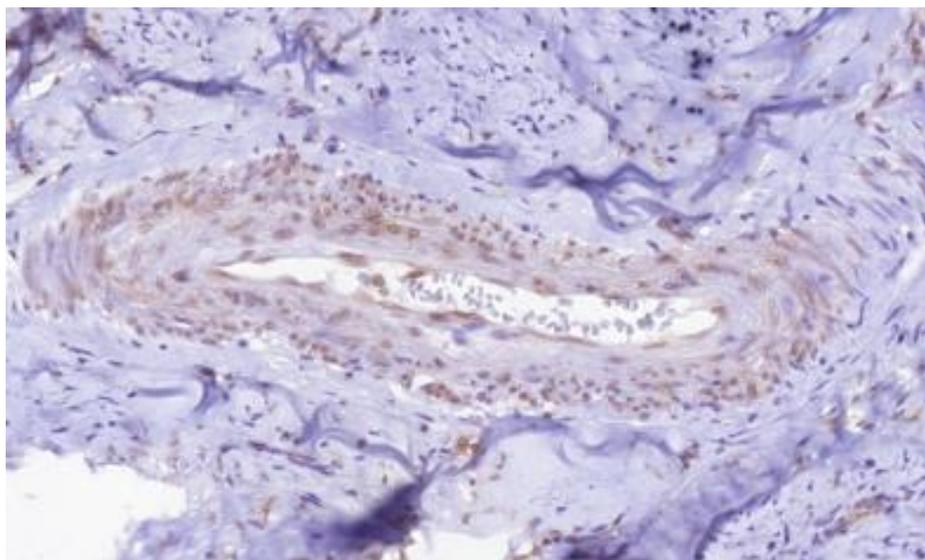
c)



d)

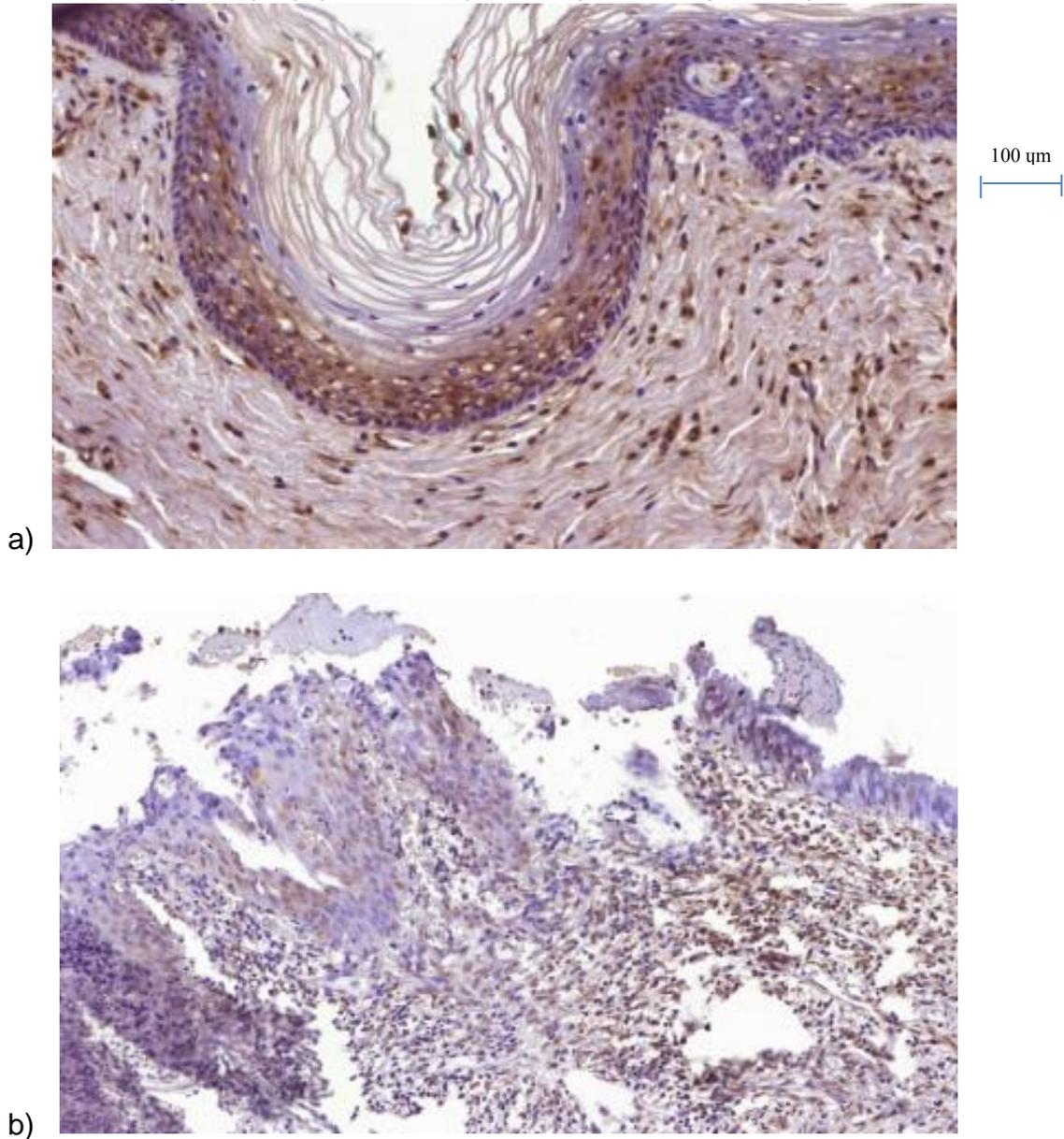


e)

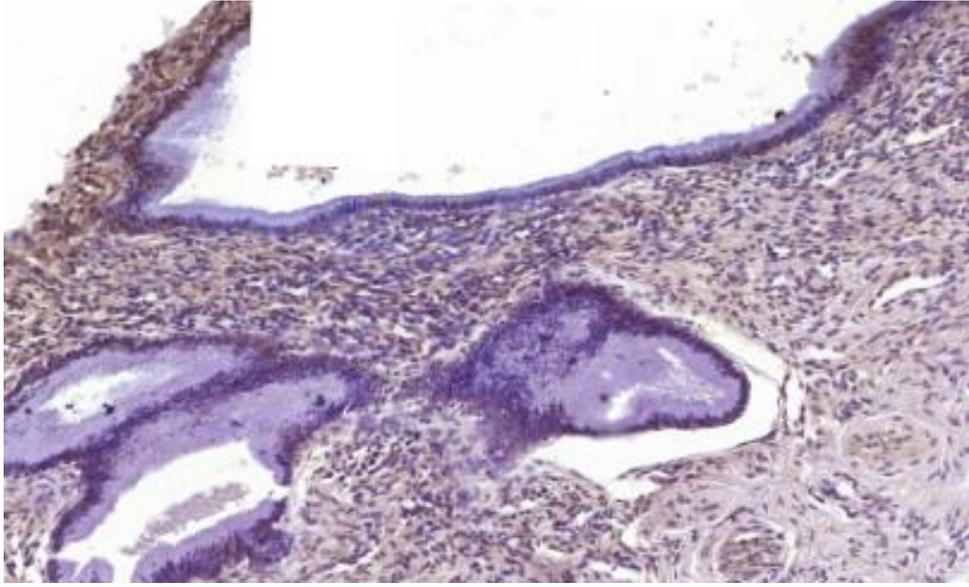


Podemos observar na Figura 6.3 que a imunomarcagem da MMP-7 se estende por dois terços do epitélio estratificado, revelando sua presença no estágio mais avançado da lesão do colo uterino, NIC II (HSIL), bem como no tecido conjuntivo e nas glândulas.

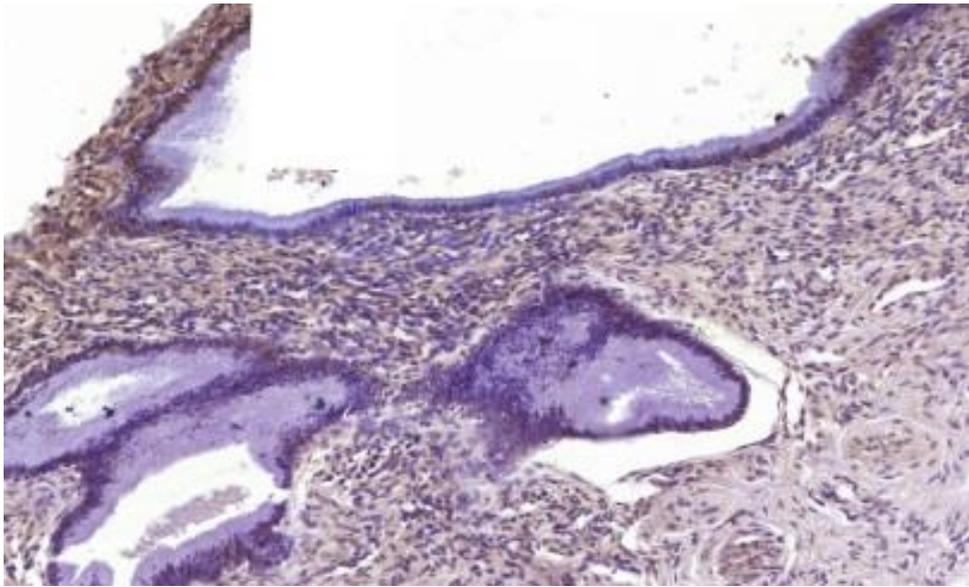
Figura 6.3 Grupo NIC II. Imunomarcagem das porções das amostras lesionadas com grau II de neoplasia (60% de imunomarcagem) a) Epitélio estratificado (endocérvice) e tecido conjuntivo b) JEC e tecido conjuntivo c) e d) Epitélio colunar (ectocérvice) e tecido conjuntivo e) Glândulas

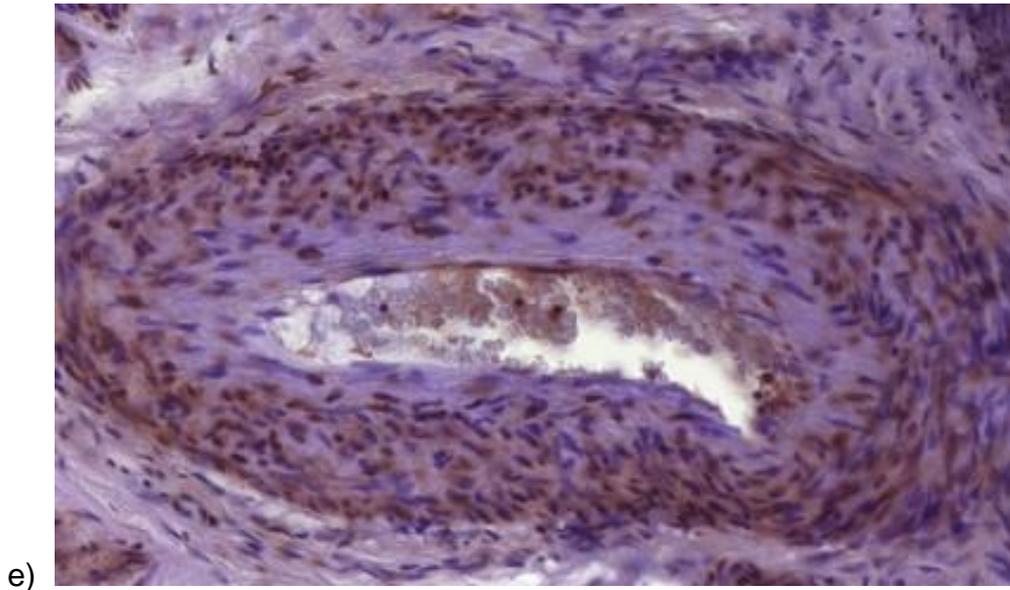


c)



d)

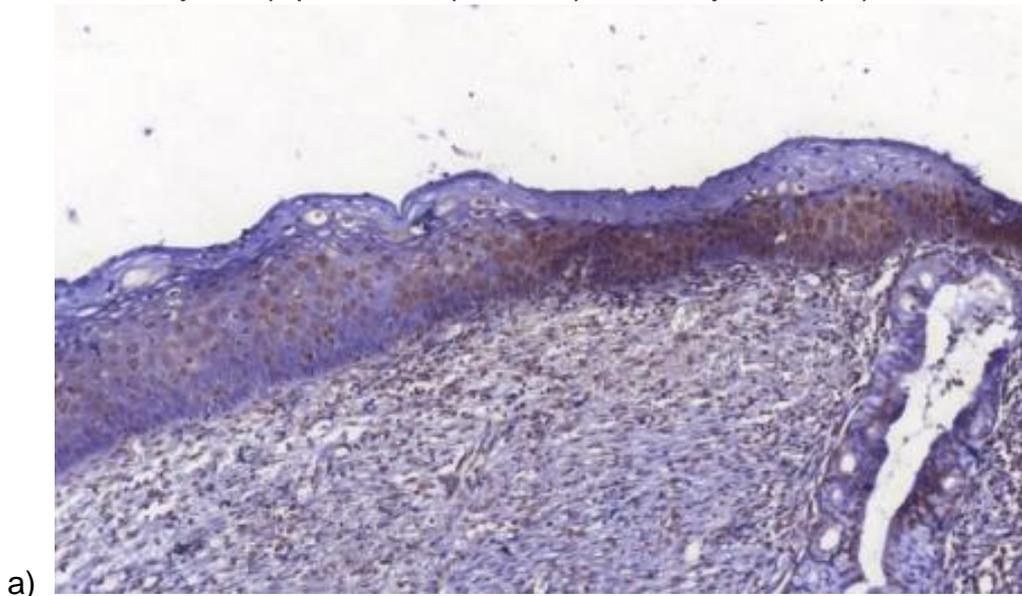


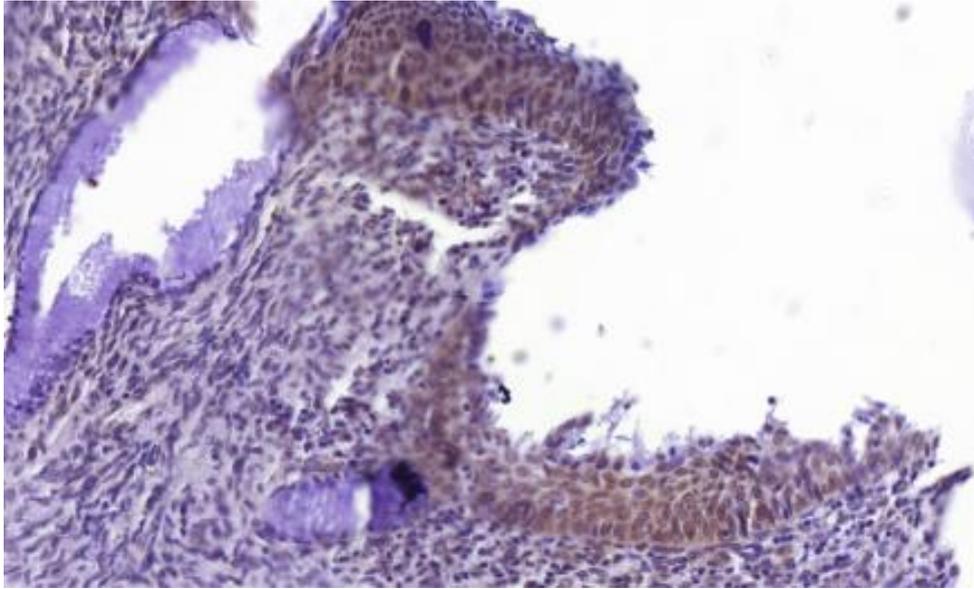


e)

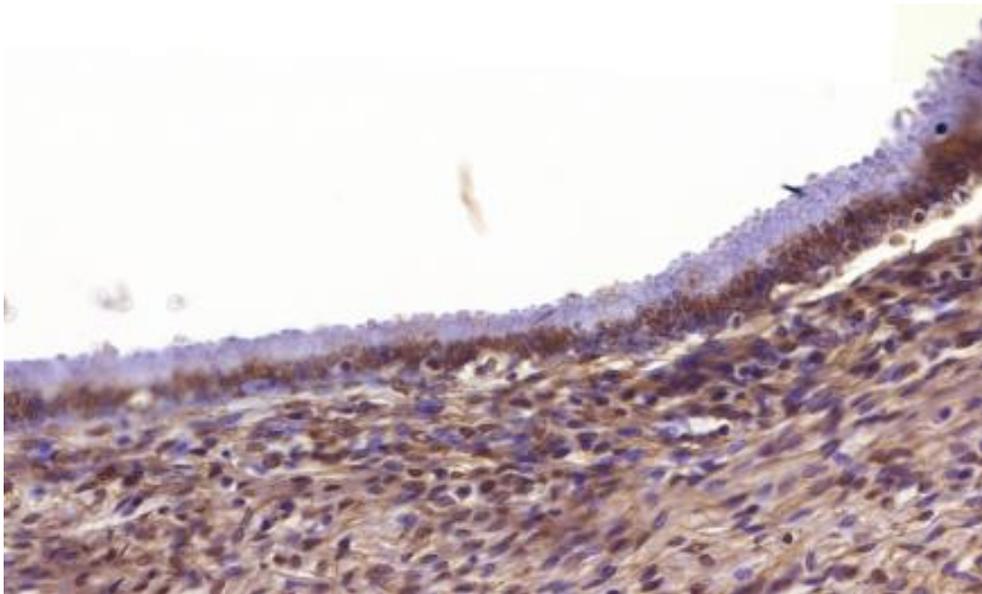
Podemos observar na Figura 6.4 a imunomarcagem da MMP-7 no grupo NIC III na totalidade do epitélio estratificado, bem como no epitélio colunar, tecido conjuntivo e nas glândulas. De fato no estágio mais agravado da lesão ocorreu uma alta taxa de imunorreatividade da proteína MMP-7, demonstrando que quanto mais avançada o grau de lesão maior a expressão da proteína no tecido.

Figura 6.4 Grupo NIC III. Imunomarcagem das porções das amostras lesionadas com grau II de neoplasia (90% de imunomarcagem) a) Epitélio estratificado (endocérvice) e tecido conjuntivo b) JEC e tecido conjuntivo c) Epitélio colunar (ectocérvice) e tecido conjuntivo e d) e e) Glândulas

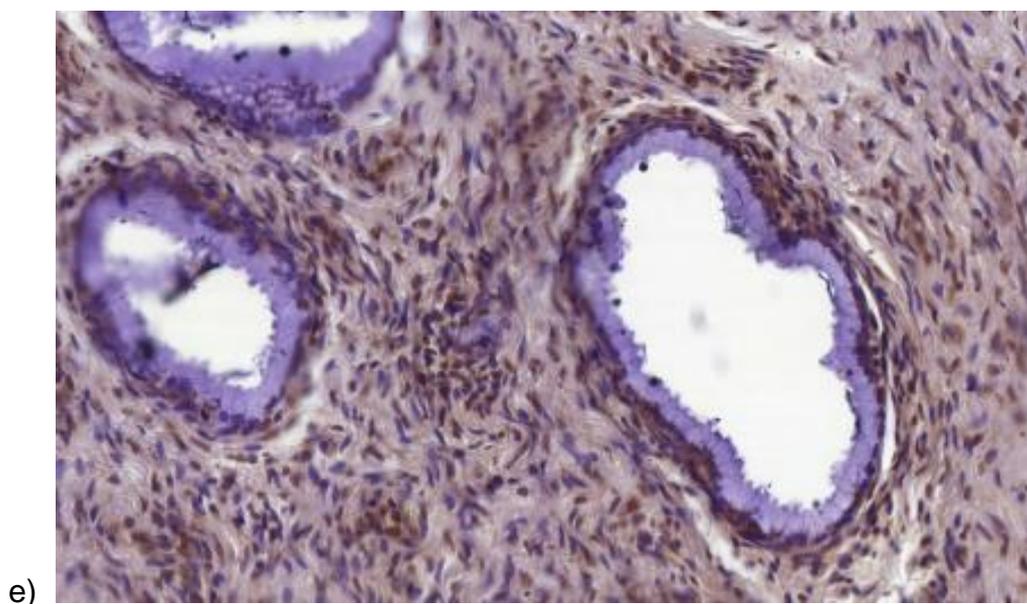
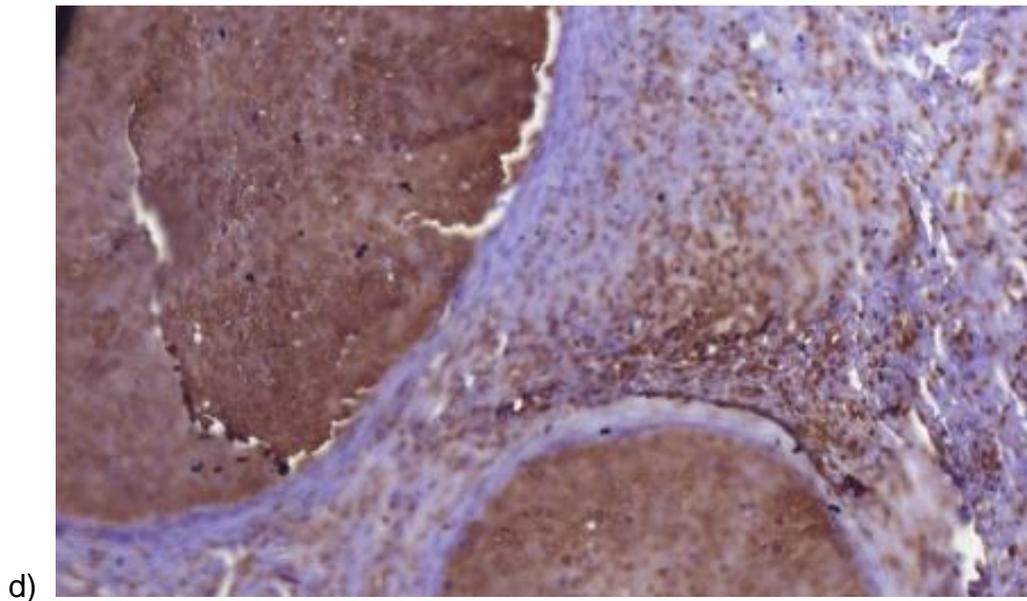




b)



c)



6.3 Associação entre MMP7 e o grau da lesão

A associação da expressão da proteína MMP-7 com o grau da lesão nas amostras observadas foi realizada com embasamento na correlação de Spearman. A observação da expressão foi realizada nas amostras seguindo o raciocínio de expressão presente ou ausente nas amostras teciduais e os casos analisados foram os classificados como neoplasia intraepitelial de grau II e III ou lesão de alto grau (HSIL). Do total de amostras analisadas (n=60), a expressão da proteína foi observada em poucos casos. Na Tabela 6.1 está

descrita a associação do grau de positividade da imunomarcagem da MMP-7 na porção do epitélio estratificado (endocérvice) do colo uterino. Observando os valores obtidos para a associação estatística, nota-se que não houve uma associação significativa entre a imunexpressão da proteína MMP-7 no epitélio da endocérvice com o grau da lesão, visto que o valor adotado como significativo foi $p < 0,05$.

Tabela 6.1 Correlação entre a expressão da proteína MMP-7 e o grau de lesão no tecido do colo uterino

		GRAU DE POSITIVIDADE DE MMP-7 NO EPITÉLIO DA ENDOCÉRVICE				
		0	+	++	+++	Total
Lesão de alto grau	ausente	8 47,1%	5 29,4%	4 23,5%	0 0%	17 100,0%
	presente	17 41,5%	11 26,8%	11 26,8%	2 4,9%	41 100,0%
	Total	25 43,1%	16 27,6%	15 25,9%	2 3,4%	58 100,0%

Teste de correlação de Spearman. $p=0.558$.

Assim como na endocérvice do epitélio, na porção da junção escamocolunar foi observado nas amostras que não houve uma correlação entre a expressão da MMP-7 e o grau da lesão tecidual. Podemos observar pela Tabela 6.2 que o valor da correlação ($p=0,748$) é menor que o valor adotado como significativo.

Tabela 6.2 Correlação entre a expressão da proteína MMP-7 e o grau de lesão no tecido do colo uterino

		GRAU DE POSITIVIDADE DE MMP-7 NO EPITÉLIO DA JEC				
		0	+	++	+++	Total
Lesão de alto grau	Ausente	15 88,2%	1 5,9%	1 5,9%	0 0%	17 100,0%
	Presente	35 85,4%	1 2,4%	2 4,9%	3 7,3%	41 100,0%
	Total	50 86,2%	2 3,4%	3 5,2%	3 5,2%	58 100,0%

Teste de correlação de Spearman. $p=0.748$.

Na porção da ectocérvice foi observado que a expressão da MMP-7 teve maior ocorrência, contudo, ainda assim, pela correlação de Spearman não

houve um paralelismo entre as variáveis já descritas. Observamos isso pelo valor de $p=0,123$.

Tabela 6.3 Correlação entre a expressão da proteína MMP-7 e o grau de lesão no tecido do colo uterino

		GRAU DE POSITIVIDADE DE MMP-7 NO EPITÉLIO DA ECTOCÉRVICE				
		0	+	++	+++	Total
Lesão de alto grau	Ausente	9 52,9%	3 17,6%	2 11,8%	3 17,6%	17 100,0%
	Presente	31 75,6%	2 4,9%	4 9,8%	4 9,8%	41 100,0%
Total		40 69,0%	5 8,6%	6 10,3%	7 12,1%	58 100,0%

Teste de correlação de Spearman. $p=0.123$.

Nas Tabelas 6.4 e 6.5 observamos que pelos valores da correlação de Spearman que a ligação entre a expressão de MMP-7 com o grau de lesão nessas porções teciduais não foi significativa. Podemos notar ainda que os valores de p se equipararam ($p=0,859/p=0,838$).

Tabela 6.4 Correlação entre a expressão da proteína MMP-7 e o grau de lesão no tecido do colo uterino

		GRAU DE POSITIVIDADE DE MMP-7 NO TECIDO CONJUNTIVO (ENDOCÉRVICE)				
		0	+	++	+++	Total
Lesão de alto grau	Ausente	6 35,3%	7 41,2%	1 5,9%	3 17,6%	17 100,0%
	Presente	14 34,1%	13 31,7%	12 29,3%	2 4,9%	41 100,0%
Total		20 34,5%	20 34,5%	13 22,4%	5 8,6%	58 100,0%

Teste de correlação de Spearman. $p=0.859$.

Tabela 6.5 Correlação entre a expressão da proteína MMP-7 e o grau de lesão no tecido do colo uterino

		GRAU DE POSITIVIDADE DE MMP-7 NO TECIDO CONJUNTIVO (JEC)				
		0	+	++	+++	Total
Lesão de alto grau	Ausente	12 70,6%	2 11,8%	2 11,8%	1 5,9%	17 100,0%
	presente	28	3	9	1	41

	68,3%	7,3%	22,0%	2,4%	100,0%
Total	40	5	11	2	58
	69,0%	8,6%	19,0%	3,4%	100,0%

Teste de correlação de Spearman. $p=0.838$

Assim como na porção do epitélio colunar (ectocérvice), o tecido conjuntivo correspondente à essa porção apresentou maior ocorrência de expressão da MMP-7 quando comparado às outras porções do tecido conjuntivo. Na Tabela 6.6 podemos observar pelo p valor ($p=0,570$), ainda que esse valor não tenha sido significativo, foi um valor mais aproximado do valor adotado.

Tabela 6.6 Correlação entre a expressão da proteína MMP-7 e o grau de lesão no tecido do colo uterino

		GRAU DE POSITIVIDADE DE MMP-7 NO TECIDO CONJUNTIVO (ECTOCÉRVICE)				
		0	+	++	+++	Total
Lesão de alto grau	Ausente	7	4	5	1	17
		41,2%	23,5%	29,4%	5,9%	100,0%
	presente	22	5	12	2	41
		53,7%	12,2%	29,3%	4,9%	100,0%
	Total	29	9	17	3	58
		50,0%	15,5%	29,3%	5,2%	100,0%

Teste de correlação de Spearman. $p=0.570$.

No tecido glandular foi observado nas Figuras 6.3 e 6.4 que houve uma expressão intensa em algumas amostras, demonstrando assim que no grau mais avançado das lesões a expressão da proteína MMP-7 é intensa. Contudo pela correlação de Spearman, como apresentado pela Tabela 6.7, não foi observado resultado significativo ($p=0,294$).

Tabela 6.7 Correlação entre a expressão da proteína MMP-7 e o grau de lesão no tecido do colo uterino

		GRAU DE POSITIVIDADE DE MMP-7 NO TECIDO GLANDULAR				
		0	+	++	+++	Total
Lesão de alto grau	ausente	5	3	4	5	17
		29,4%	17,6%	23,5%	29,4%	100,0%
	presente	16	6	15	4	41
		39,0%	14,6%	36,6%	9,8%	100,0%

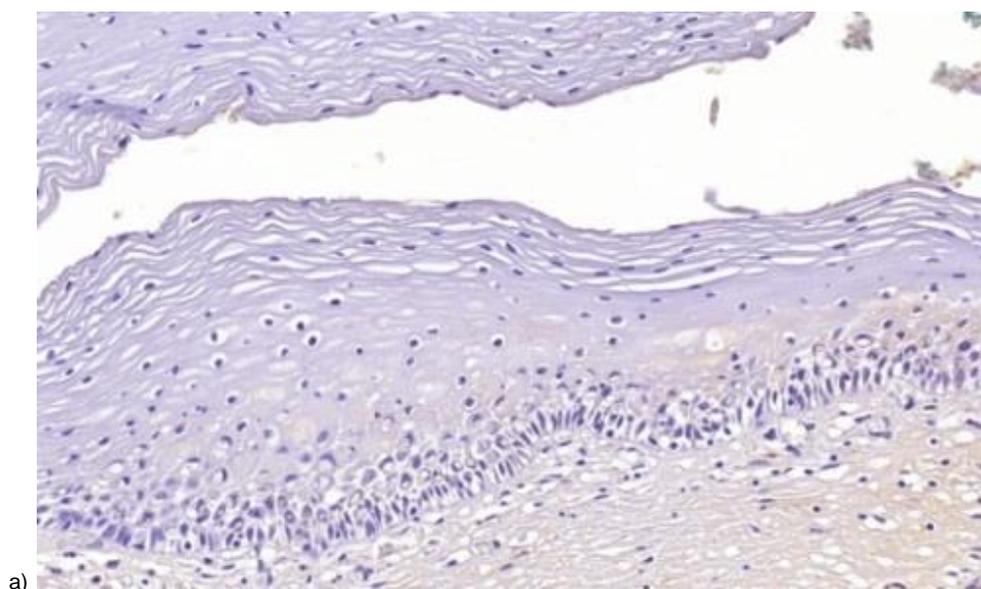
Total	21	9	19	9	58
	36,2%	15,5%	32,8%	15,5%	100,0%

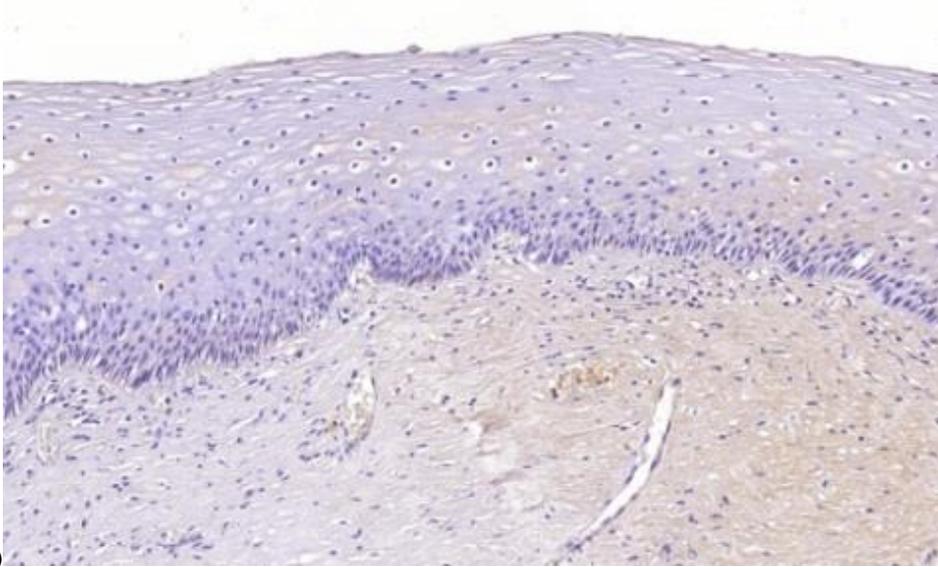
Teste de correlação de Spearman. $p=0.294$.

6.4 Análise imuno-histoquímica HPV

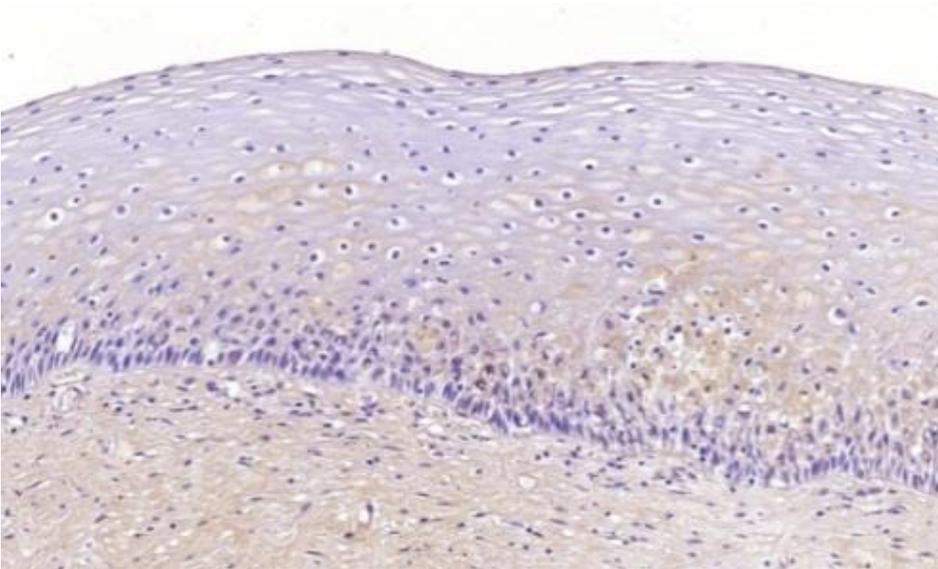
A análise da imunomarcagem do HPV foi realizada através da observação da positividade ou negatividade nas amostras histológicas, sendo que as mesmas foram divididas de acordo com o grau da lesão (Controle, NIC I, NIC II e NIC III) nos diferentes compartimentos do epitélio e do tecido conjuntivo, assim como no ensaio de imunomarcagem da proteína MMP-7. Na Figura 6.5 está descrita a porção normal da endocérvice do colo uterino. Podemos notar que não houve imunomarcagem na porção observada. Isso se dá devido à ausência do vírus HPV na mesma. Além disso, na membrana basal pode-se observar uma camada nítida de células organizadas, com núcleos em intensa atividade metabólica e ao longo da diferenciação do epitélio ocorre a diminuição do tamanho nuclear devido à redução da atividade metabólica, que é característica do epitélio estratificado normal.

Figura 6.5 Grupo Controle. Imunomarcagem das porções de amostras controle (0% de imunomarcagem) a) b) e c) Epitélio estratificado (endocérvice) e tecido conjuntivo d) Epitélio colunar (ectocérvice)

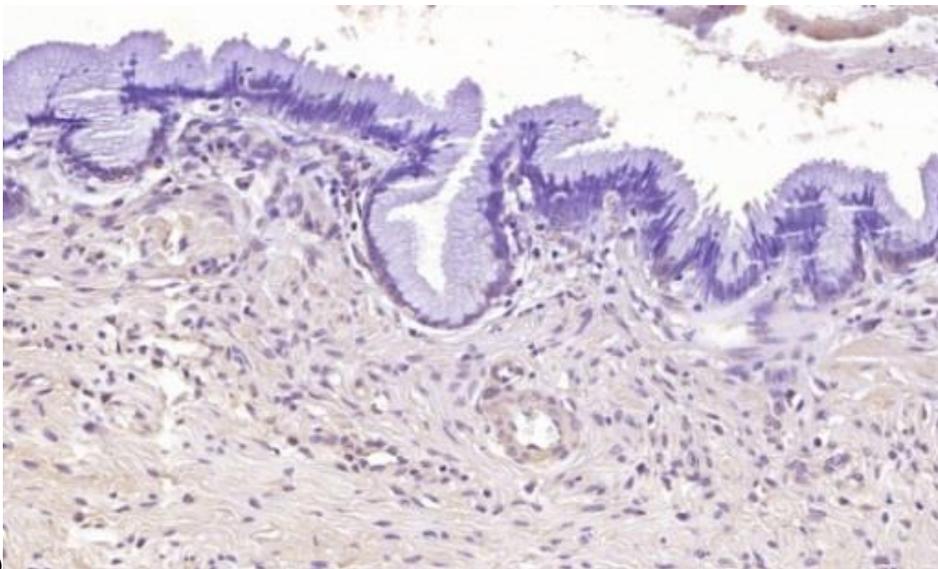




b)



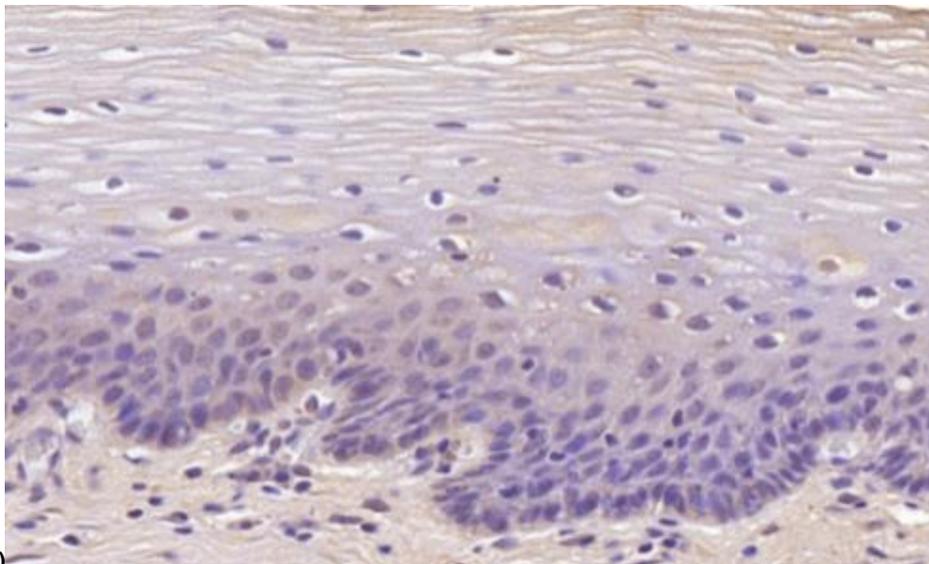
c)



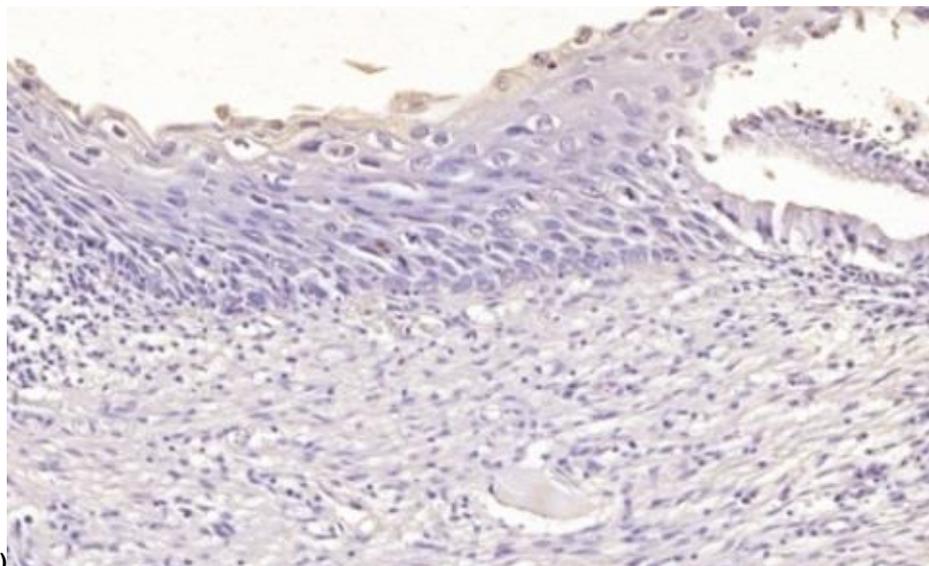
d)

Nas amostras classificadas com neoplasia de grau I foi observado que apenas na camada basal da membrana epitelial houve uma desestruturação, característica da presença viral. As células na camada basal apresentam intensa atividade metabólica e o seu crescimento e diferenciação é de forma desorganizada. Na diferenciação do epitélio, observa-se a presença de núcleos anormais, ocorrência de binucleação e halos em volta do núcleo. Além disso, podemos notar imunomarcção pelo ensaio de imunohistoquímica na camada basal (Figura 6.6)

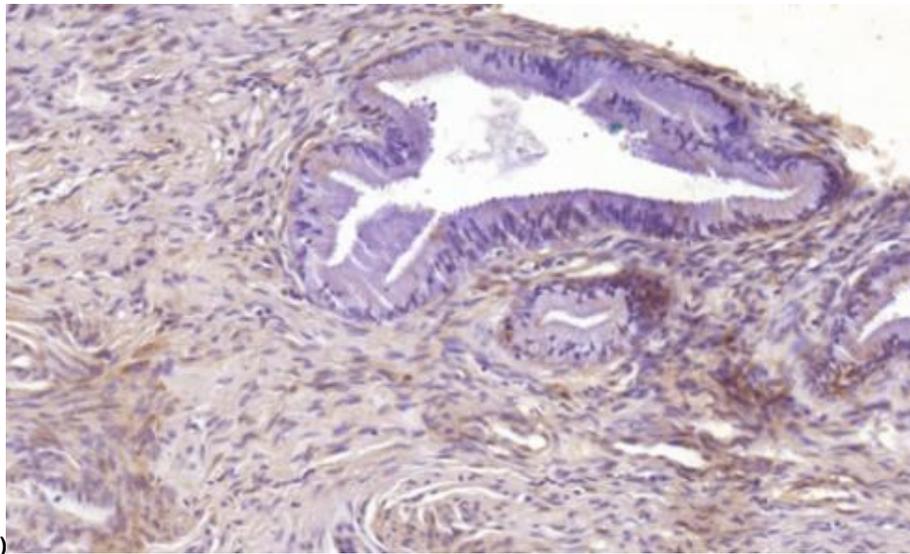
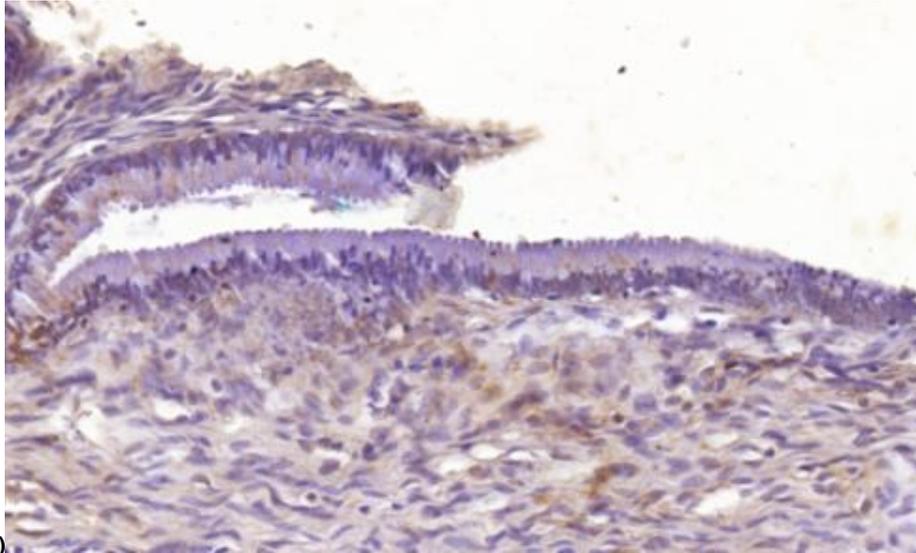
Figura 6.6 Grupo NIC I. Imunomarcção das porções das amostras lesionadas com grau I de neoplasia (30% de imunomarcção) a) Epitélio estratificado (endocérvice) e tecido conjuntivo b) JEC e tecido conjuntivo c) Epitélio colunar (ectocérvice) e tecido conjuntivo e d) Glândulas



a)

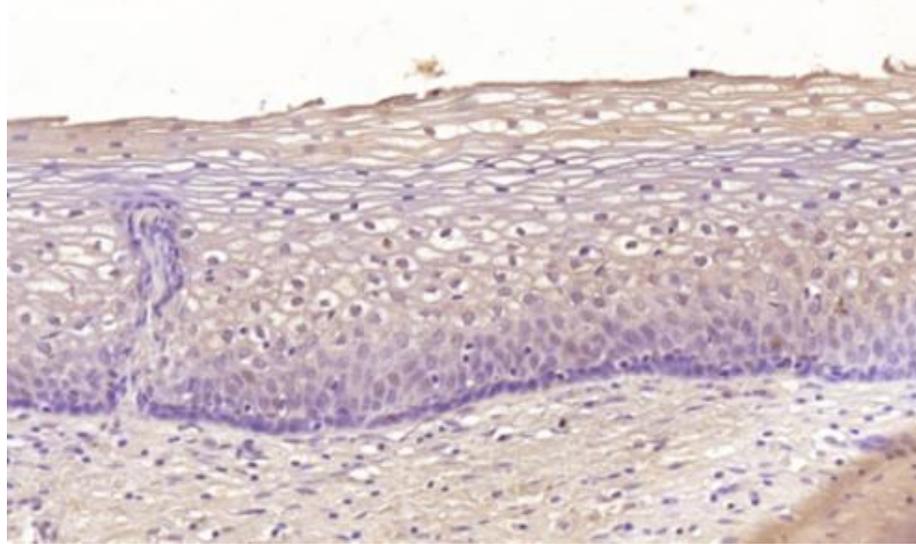


b)

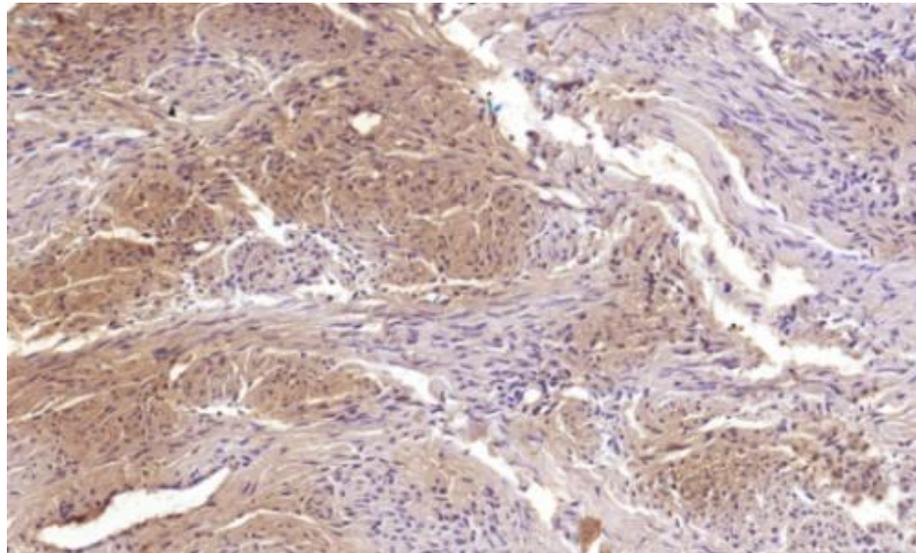


Nas amostras com grau de lesão II, observou-se um aumento de proliferação celular por dois terços do epitélio. Podemos notar na Figura 6.7 que os núcleos se encontram em tamanhos duplicados, indicando atividade metabólica acelerada, além disso, na porção da endocérvice há a ocorrência de binucleação, núcleos em formatos anormais, halos em volta dos núcleos e imunomarcação do ensaio de imunohistoquímica, apontando a presença do vírus nas células.

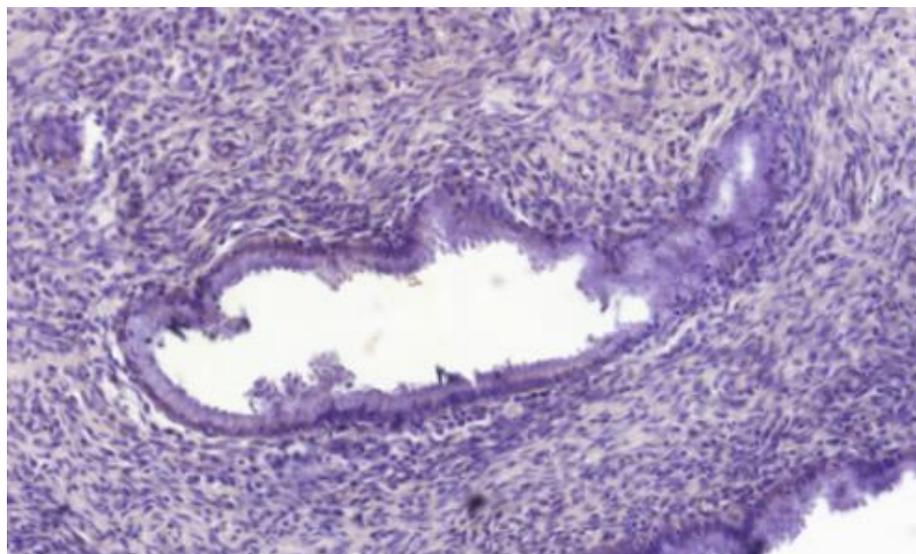
Figura 6.7 Grupo NIC II. Imunomarcção das porções das amostras lesionadas com grau I de neoplasia (60% de imunomarcção) a) Epitélio estratificado (endocérvice) e tecido conjuntivo b) JEC e tecido conjuntivo c) Epitélio colunar (ectocérvice) e tecido conjuntivo e d) Glândulas



a)



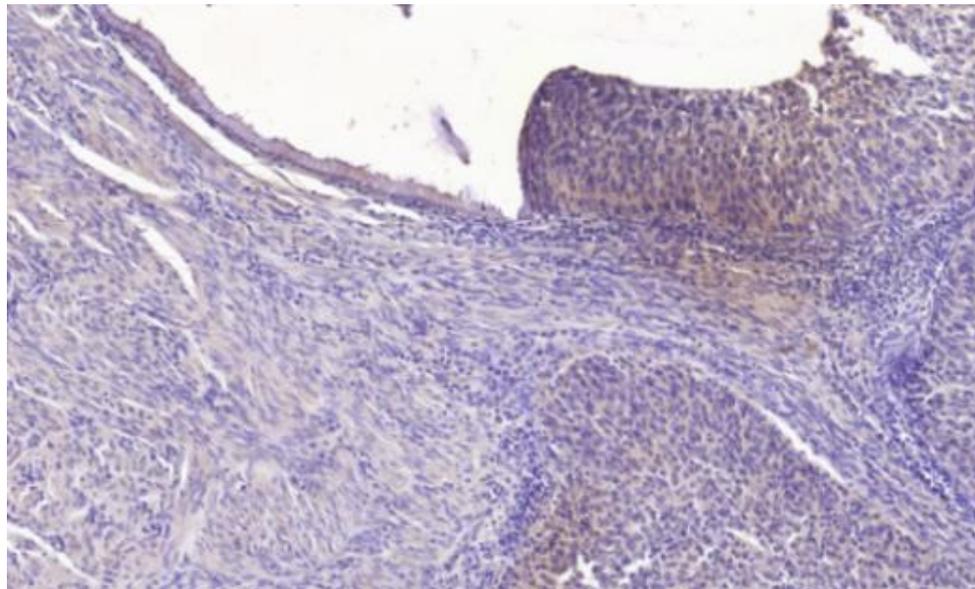
b)



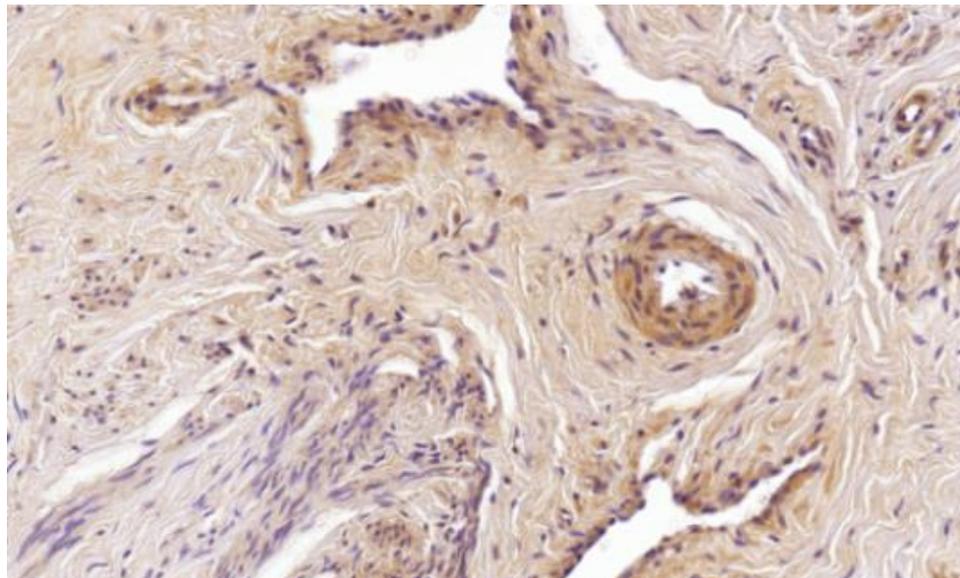
c)

Em amostras com lesão de grau III, nota-se que há uma intensa proliferação celular, indicando a presença do vírus, além disso pode ser observado que as células se estendem pela camada do epitélio de forma anormal, com a presença de núcleos grandes desde a camada basal até a última camada de diferenciação celular dessa porção do tecido (Figura 6.8).

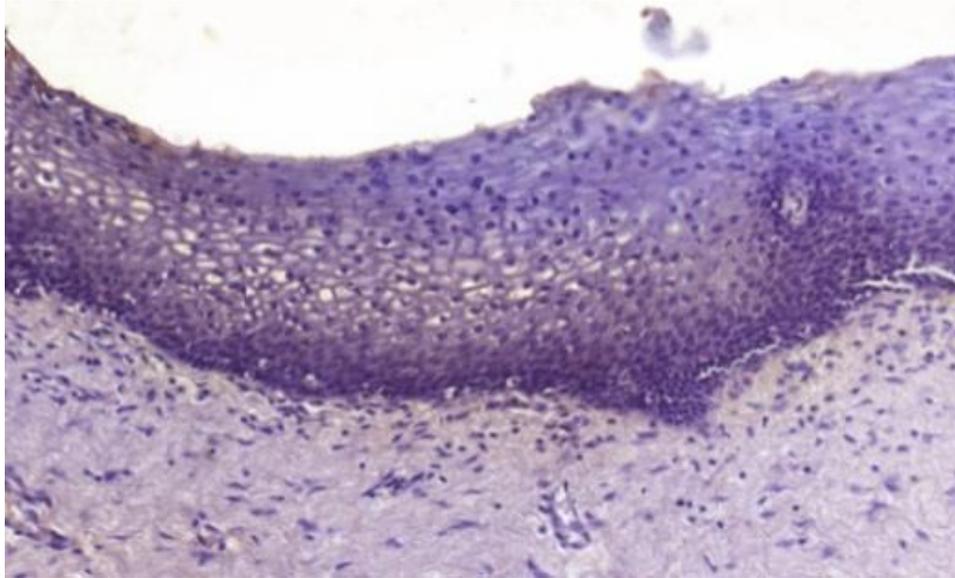
Figura 6.8 Grupo NIC III. Imunomarcção das porções das amostras lesionadas com grau I de neoplasia (90% de imunomarcção) a) JEC e tecido conjuntivo tecido b) Glândulas e c) Epitélio estratificado (endocérvice)



a)



b)



De acordo com as imagens podemos notar que existe uma progressão da presença do vírus nos diferentes estágios da lesão (tecido normal ao grau III da neoplasia). Além disso, as características da presença do vírus nas células do epitélio descritas por outras investigações foram observadas nos ensaios de imunohistoquímica realizados neste trabalho. Apesar da visualização dessas características relacionadas à presença do vírus nas porções no epitélio, no teste estatístico não foram obtidos valores significativos adotando o p -valor $<0,05$. Na Tabela 6.8 foi feita a correlação da presença do vírus na porção da endocérvice e o $p=0.102$

Tabela 6.8 Correlação entre a presença do HPV e o grau de lesão no tecido do colo uterino

		POSITIVIDADE DO HPV NO EPITÉLIO DA ENDOCÉRVICE		
		Negativo	Positivo	Total
Lesão de alto grau	ausente	14 82,4%	3 17,6%	17 100,0%
	presente	33 97,1%	1 2,9%	34 100,0%
Total		47 92,2%	4 7,8%	51 100,0%

Teste Exato de Spearman $p=0.102$

Na porção da junção escamocolunar não foi observada a presença do vírus em nenhuma amostra, sendo assim não foi obtido um valor para o p. (Tabela 6.9)

Tabela 6.9 Correlação entre a presença do HPV e o grau de lesão no tecido do colo uterino

		POSITIVIDADE DO HPV NO EPITÉLIO DA JEC	
		Negativo	Total
Lesão de alto grau	ausente	17 100,0%	17 100,0%
	presente	34 100,0%	34 100,0%
	Total	51 100,0%	51 100,0%

Na porção da ectocérvice foi observada a presença do HPV em algumas amostras, resultados demonstrados pela Tabela 6.10. Contudo essa observação foi realizada em amostras que não possuíam a lesão no tecido do colo uterino, por isso o teste obteve um $p=0,033$, teoricamente significativo, contudo não válido para o objetivo pré-estabelecido. Esse é um resultado que deve ser esclarecido em outros trabalhos futuros.

Tabela 6.10 Correlação entre a presença do HPV e o grau de lesão no tecido do colo uterino

		POSITIVIDADE DO HPV NO EPITÉLIO DA ECTOCÉRVICE		
		Negativo	Positivo	Total
Lesão de alto grau	Ausente	14 82,4%	3 17,6%	17 100,0%
	presente	34 100,0%	0 ,0%	34 100,0%
	Total	48 94,1%	3 5,9%	51 100,0%

Teste Exato de Spearman $p=0.033$

No tecido glandular foi notada a presença de características da presença do HPV na maioria das amostras. Na Tabela 6.11 podemos observar a correlação, resultando em um valor de $p=0,087$, sendo este valor o mais próximo do valor significativo adotado $p<0,05$. Podemos notar também na Figura 6.8 (c) que o tecido glandular apresentou completa imunomarcagem das células nesta porção do tecido.

Tabela 6.11 Correlação entre a presença do HPV e o grau de lesão no tecido do colo uterino

		POSITIVIDADE DP HPV NO TECIDO GLANDULAR		
		Negativo	Positivo	Total
Lesão de alto grau	ausente	13 76,5%	4 23,5%	17 100,0%
	presente	32 94,1%	2 5,9%	34 100,0%
Total		45 88,2%	6 11,8%	51 100,0%

Teste Exato de Spearman $p=0.087$

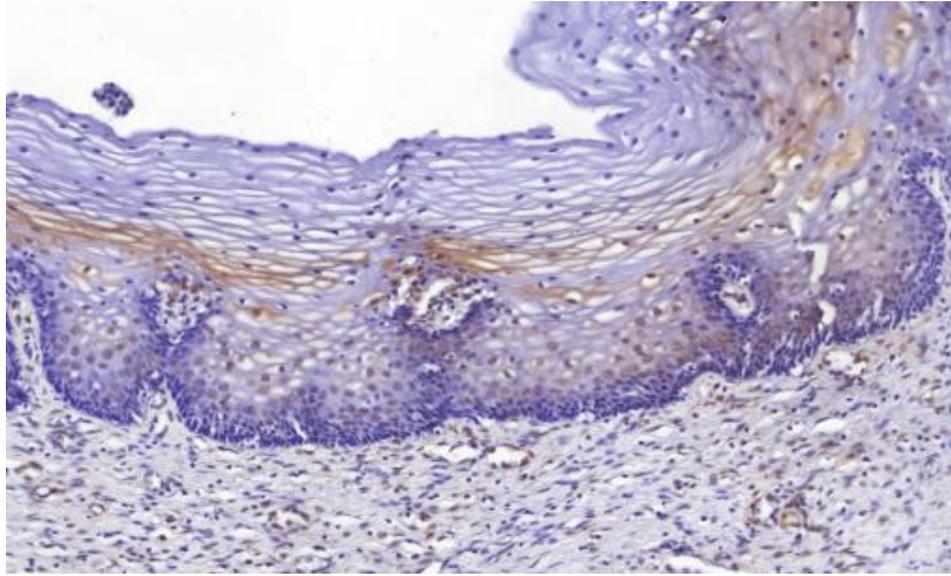
6.5 Análise imuno-histoquímica EBV

A análise da imunomarcção do EBV foi feitas através da observação da presença ou ausência do vírus nas células do epitélio das amostras assim como foi feito com o HPV.

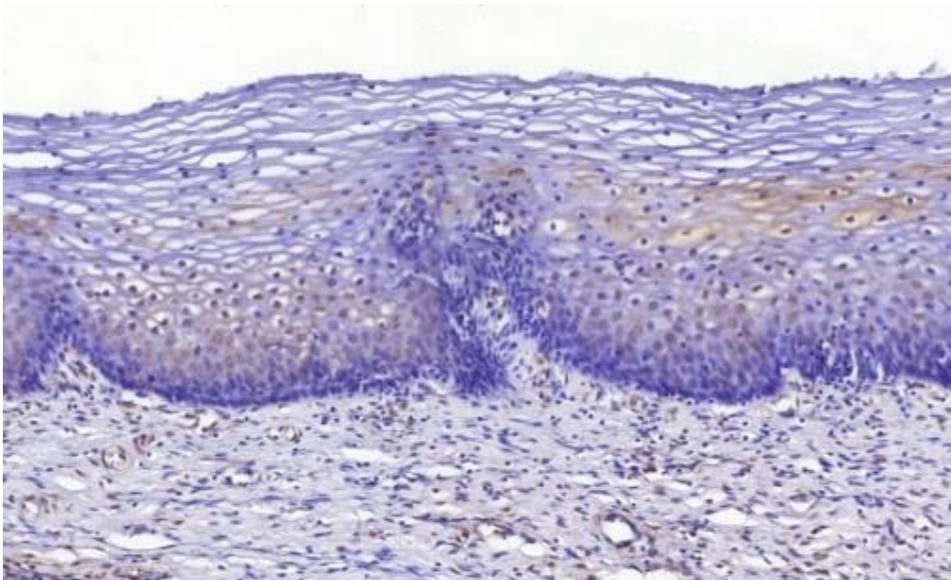
De acordo com a literatura já descrita, o Epstein-Barr vírus é responsável pelo desenvolvimento de diversos tipos de malignidades epiteliais, contudo o seu papel na transformação das malignidades humanas permanece não totalmente estabelecido, particularmente em cânceres epiteliais (TSAO et al., 2015). Visto que o câncer do colo uterino se desenvolve na camada epitelial, é provável que o vírus EBV esteja presente nas camadas do epitélio em auxílio ao vírus HPV.

Sendo assim foi observado em ensaio de imuno-histoquímica a presença do vírus em células do epitélio ao longo da camada epitelial e de acordo com o grau de lesão analisado. As amostras foram divididas de acordo com o grau da lesão (Controle, NIC I, NIC II e NIC III) nos diferentes compartimentos do epitélio e do tecido conjuntivo. A Figura 6.9 representa a porção da endocérvice em amostras de lesão de grau I, onde foi observado a imunomarcção do vírus em células epiteliais. Os núcleos se encontram corados com o composto Diaminobenzidine detectados pela reação imunohistoquímica do anticorpo utilizado na reação. Além disso, os núcleos das células na camada basal se encontram em alta atividade metabólica, resultando em dimensões maiores do que o normal.

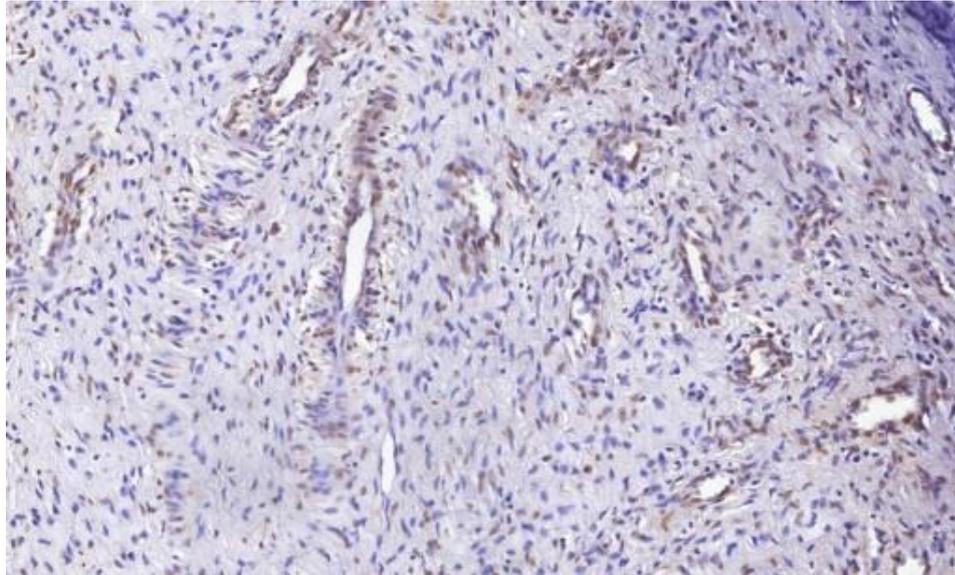
Figura 6.9 Grupo NIC I. Imunomarcção do vírus EBV nas porções de amostras com grau de lesão I (27% de imunomarcção) a) e b) Epitélio estratificado (endocérvice) e tecido conjuntivo c) Tecido Conjuntivo d) Glândulas



a)

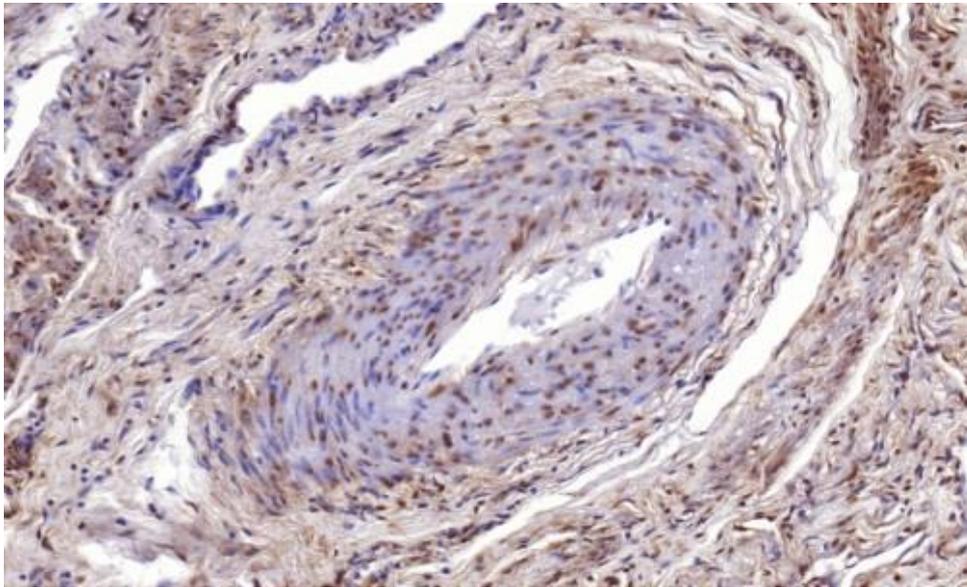


b)



c)

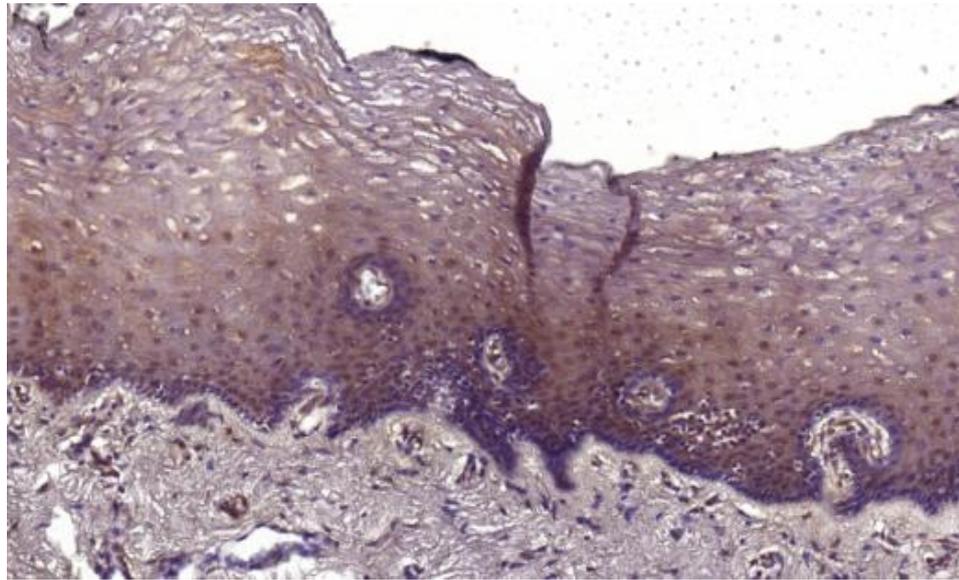
d)



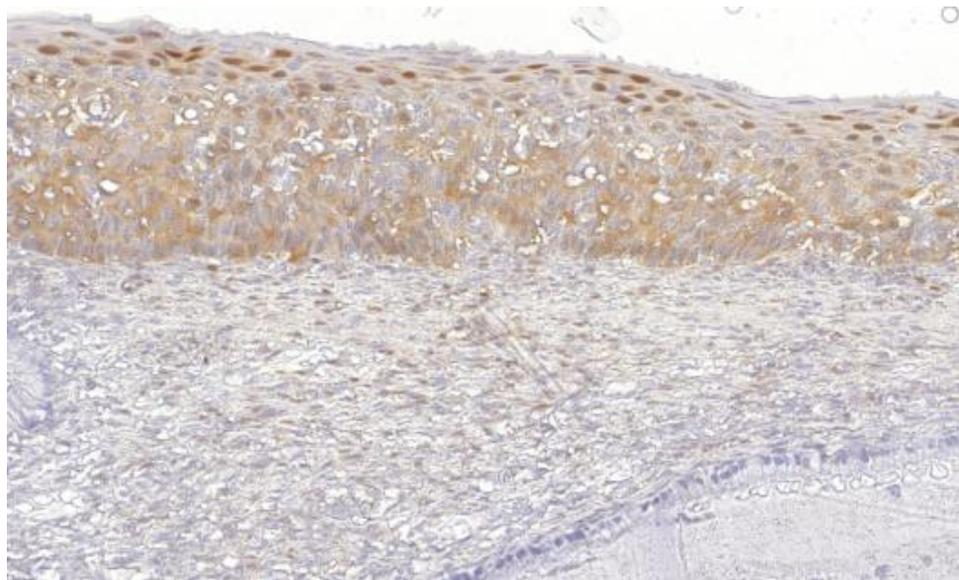
e)

No grupo de amostras com neoplasia grau III nota-se que a presença do EBV é mais evidente. Na Figura 6.10 podemos verificar a imunomarcção é completa nas camadas epiteliais devido à presença do vírus nas células.

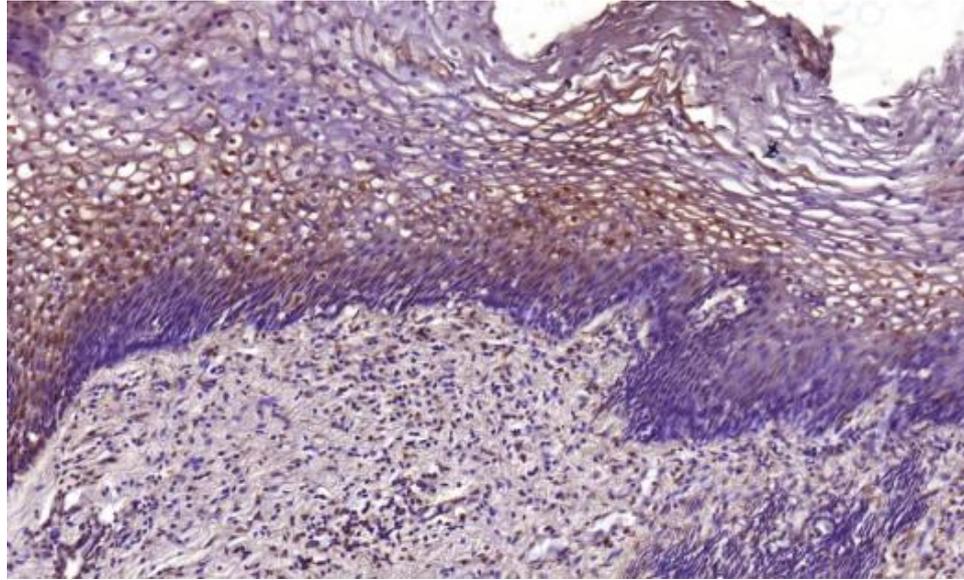
Figura 6.10 Grupo NIC III. Imunomarcção do vírus EBV nas porções de amostras com grau de lesão III (97% de imunomarcção) a) b) e c) Epitélio estratificado (endocérvice) e tecido conjuntivo c) Tecido Conjuntivo d) Tecido glandular



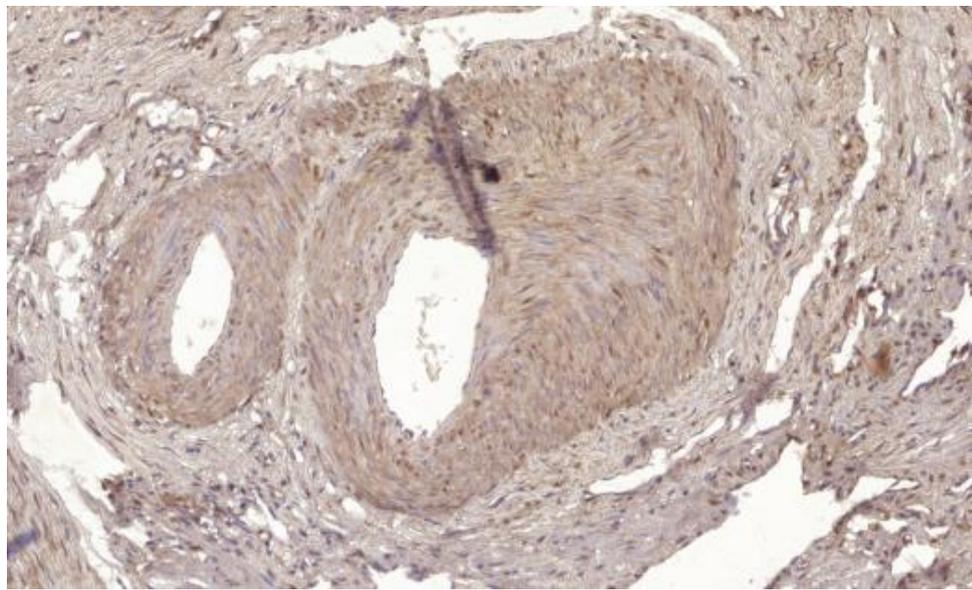
a)



b)



c)



d)

De acordo com a Tabela 6.12 a correlação entre a presença do EBV na porção da endocérvice não é significativa, pois nota-se que o p-valor foi $p=0,745$, contudo nos casos positivos, foi possível observar a confirmação da presença do vírus nessa porção do epitélio, especialmente na camada basal, pelo ensaio de imuno-histoquímica, como demonstrado pela Figura 6.9

Tabela 6.12 Correlação entre a presença do EBV e o grau de lesão no tecido do colo uterino

		POSITIVIDADE DO EBV NO EPITÉLIO DA ENDOCÉRVICE		
		Negativo	Positivo	Total
Lesão de alto grau	ausente	8	7	15

	53,3%	46,7%	100,0%
presente	11	14	25
	44,0%	56,0%	100,0%
Total	19	21	40
	47,5%	52,5%	100,0%

Teste exato de Spearman $p=0,745$

Na Tabela 6.13 a estatística está favorável ao que se esperava para a porção da junção escamocolunar do epitélio, contudo podemos notar que os resultados são referentes negatividade do vírus em amostras com lesão de alto grau. Por essa razão o $p=0,046$, o que seria significativo se caso a presença do EBV fosse positiva nas amostras com lesão de alto grau.

Tabela 6.13 Correlação entre a presença do EBV e o grau de lesão no tecido do colo uterino

		POSITIVIDADE DO EBV NO EPITÉLIO DA JEC		
		Negativo	Positivo	Total
Lesão de alto grau	ausente	12	3	15
		80,0%	20,0%	100,0%
	presente	25	0	25
		100,0%	,0%	100,0%
	Total	37	3	40
		92,5%	7,5%	100,0%

Teste exato de Spearman $p=0,046$

Na porção da ectocérvice, não houve resultado significativo quanto à presença do EBV, pois de um total de 40 amostras, apenas 13 apresentaram a ocorrência do vírus, contudo sendo o número amostral um pouco reduzido, esse valor poderia se tornar significativo, visto que pelas imagens apresentadas, é visível a forte presença do vírus nas porções epiteliais estudadas.

Tabela 6.14 Correlação entre a presença do EBV e o grau de lesão no tecido do colo uterino

		POSITIVIDADE DO EBV NO EPITÉLIO DA ECTOCÉRVICE		
		Negativo	Positivo	Total
Lesão de alto grau	Ausente	11	4	15
		73,3%	26,7%	100,0%
	Presente	16	9	25
		64,0%	36,0%	100,0%
	Total	27	13	40

67,5% 32,5% 100,0%

Teste exato de Spearman $p=0,730$

O tecido glandular foi a porção com maior impacto na presença do vírus, ainda não foi esclarecido em literatura o fundamento para tal fato. De acordo com a Tabela 6.15, podemos notar que 17 casos de 40 apresentaram o vírus EBV na porção glandular do tecido do colo uterino. Ainda que o valor de p não tenha sido significativo, verificou-se que ocorre a presença do vírus no tecido de forma considerável.

Tabela 6.15 Correlação entre a presença do EBV e o grau de lesão no tecido do colo uterino

		POSITIVIDADE DO EBV NO TECIDO GLANDULAR		
		Negativo	Positivo	Total
Lesão de alto grau	ausente	11 73,3%	4 26,7%	15 100,0%
	presente	12 48,0%	13 52,0%	25 100,0%
	Total	23	17	40
		57,5%	42,5%	100,0%

Teste exato de Spearman $p=0,187$

No tecido conjuntivo correspondente às porções do epitélio estudadas, não foi realizada a análise estatística dos testes, pois de acordo com os resultados obtidos pela observação às cegas foi visto que de 40 casos com lesão de alto grau apenas 3 forneceram resultado positivo quanto à imunomarcagem do EBV nas células pelo imunoensaio realizado.

6.6 Análise estatística

Para avaliar a diferença de expressão da MMP-7 entre células das lesões cervicais a estatística empregada foi a de Spearman, que é o coeficiente de correlação linear de Pearson aplicado aos postos dos dados, obtidos independentemente para cada variável. O coeficiente de correlação de Spearman é dado por:

$$r_s = 1 - \frac{6 \times \sum_{i=1}^n d_i^2}{n^3 - n}$$

em que $d_i = r_{x_i} - r_{y_i}$, com r_{x_i} e r_{y_i} variam de 1 a n .

Foi realizada então uma associação entre a expressão da MMP-7 e a presença dos vírus HPV e EBV através dessa correlação, os quais se encontram nos quadros 6.1 e 6.2.

Podemos notar no quadro 6.1 que existe uma relação significativa entre a expressão da MMP-7 na porção da junção escamocolunar com a presença do vírus HPV no epitélio da endocérvice. Além disso, essa relação também é verificada pela expressão da MMP-7 e da presença do vírus no tecido conjuntivo da área da junção escamocolunar e na porção da ectocérvice.

QUADRO 6.1 Relação entre expressão de MMP7 e presença de HPV16/18

	(n=42)	HPV_END	HPV_ECT	HPV_TCECT	HPV_GL
MMP7_END	<i>Coeficiente de correlação</i>	0,205	0,010	-0,177	-0,071
	<i>p</i>	0,192	0,951	0,262	0,657
MMP7_JEC	<i>Coeficiente de correlação</i>	0,357	0,262	-0,057	0,092
	<i>p</i>	0,020*	0,093	0,719	0,564
MMP7_ECT	<i>Coeficiente de correlação</i>	0,102	0,096	-0,102	-0,082
	<i>p</i>	0,519	0,546	0,518	0,607
MMP7_TCEND	<i>Coeficiente de correlação</i>	0,249	0,300	-0,007	0,089
	<i>p</i>	0,112	0,05*	0,966	0,575
MMP7_TCJEC	<i>Coeficiente de correlação</i>	0,193	0,413	0,158	0,127
	<i>p</i>	0,221	0,007*	0,317	0,424
MMP7_TCECT	<i>Coeficiente de correlação</i>	0,112	0,350	0,065	0,037
	<i>p</i>	0,481	0,023*	0,684	0,815
MMP7_GL	<i>Coeficiente de correlação</i>	0,070	0,242	-0,176	-0,019
	<i>p</i>	0,659	0,123	0,265	0,904

Também foi realizada uma associação entre a expressão da MMP-7 e a presença do vírus EBV. Nessa relação foi observada uma relação entre a presença do vírus na porção da endocérvice com a expressão da MMP-7 no tecido conjuntivo da endocérvice.

QUADRO 6.2 Relação entre expressão de MMP7 e presença de EBV

		EBV END	EBV JEC	EBV ECT	EBV TCEND	EBV TCJEC	EBV TCECT	EBV GL
MMP7 END	<i>C.Correl.</i>	0,22	-0,112	-0,105	0,091	-0,112	-0,105	-0,049
	<i>p</i>	0,227	0,543	0,568	0,622	0,543	0,568	0,789
MMP7 JEC	<i>C.Correl.</i>	0,075	-0,111	-0,087	0,211	-0,111	-0,087	0,062
	<i>p</i>	0,683	0,547	0,637	0,247	0,547	0,637	0,736
MMP7 ECT	<i>C.Correl.</i>	0,042	-0,206	-0,256	0,093	-0,206	-0,256	-0,028
	<i>p</i>	0,819	0,259	0,157	0,614	0,259	0,157	0,878
MMP7 TCEND	<i>C.Correl.</i>	0,356*	-0,036	0,179	0,281	-0,036	0,179	0,16
	<i>p</i>	0,045	0,843	0,327	0,119	0,843	0,327	0,383
MMP7 TCJEC	<i>C.Correl.</i>	0,248	0,12	0,121	0,309	0,12	0,121	0,074
	<i>p</i>	0,17	0,514	0,511	0,085	0,514	0,511	0,687
MMP7 TCECT	<i>C.Correl.</i>	0,139	0,144	0,016	0,14	0,144	0,016	0,081
	<i>p</i>	0,448	0,433	0,932	0,444	0,433	0,932	0,66
MMP7 GL	<i>C.Correl.</i>	0,16	-0,088	0,065	0,118	-0,088	0,065	0,105
	<i>p</i>	0,383	0,632	0,724	0,52	0,632	0,724	0,569

7. DISCUSSÃO

7.DISSCUSSÃO

No presente estudo, investigamos a correlação da expressão da MMP-7 com o grau das lesões no colo uterino para verificar a provável associação entre os mesmos, em conjunto com a infecção dos vírus HPV e EBV. Temos bem descrito pela literatura que quanto maior o estágio da lesão, maior é a expressão da MMP-7 em neoplasias, devido ao seu potencial em contribuir na metástase de tumores e no auxílio de invasão das células através de vasos linfáticos. Além disso, não há nenhum outro estudo que correlaciona o nível de expressão da MMP-7 com os parâmetros clínicos e biológicos das lesões do câncer uterino. Este é o primeiro estudo que compara o perfil de imunexpressão nos diversos estágios de lesões do colo uterino.

De todas as MMPs, a MMP-7 pode ser de grande importância na evolução da neoplasia e do câncer já em estado avançado, pois ela age nas propriedades de adesão de membrana, é capaz de ativar outras MMPs, como a MMP-2, -8 e -9 e possui a capacidade de clivar outras moléculas bioativas (SIER et al., 2008). Além disso, pelos resultados obtidos pela correlação realizada com as amostras imunomarcadas podemos concluir que a MMP-7 pode estar relacionada com a persistência dos vírus nas células infectadas, pois através dos resultados estatísticos os quadros 5.1 e 5.2 indicam que há uma correlação significativa entre a presença dos vírus e a expressão da MMP-7 nas células do tecido epitelial com lesão celular. Ademais, em estudo de MAKINEN e colaboradores, em carcinoma de células escamosas da cavidade oral foi sugerido que a expressão da MMP-7 estava associada com a metástase em estágios precoces das lesões (MAKINEN et al., 2014). Nas imagens capturadas pelas lâminas dos imunossaior foi observado que a imunorreatividade da MMP-7 foi detectada não somente no epitélio em que havia lesões, mas também no epitélio normal e em células do tecido conjuntivo e seu padrão de expressão foi aumentando de acordo com a evolução do grau das lesões, o que corrobora com os dados de MYLONA e colaboradores, que realizaram o estudo com base na detecção da expressão da MMP-7 em células do estroma das lesões, assim como nas células normais do epitélio estratificado e glandular (MYLONA et al., 2005).

De acordo com o estudo realizado por Herfs e colaboradores, a junção escamocolunar é o local com maior ocorrência de início de lesão nas células epiteliais, pois é o local com maior susceptibilidade, devido à presença de dois tipos celulares distintos com funções diferentes. Nesse experimento, foi observado que na junção escamocolunar de alguns casos com lesão celular o vírus HPV estava presente, assim como o EBV. Além disso, foi notada uma forte expressão da MMP-7 nas células dessa porção epitelial, ainda que nos testes estatísticos tenha sido visto que não foram obtidos resultados significativos. Ademais, as estimativas histológicas dos graus de lesão são subjetivas e sujeitas a erros observacionais dos operadores.

A imunomarcagem da expressão da MMP-7 foi observada nas células epiteliais e nas células do tecido conjuntivo. Essa observação é devido à expressão da MMP-7 em todos os tipos celulares. Além disso, essa proteína pode ser encontrada no citoplasma ou no núcleo das células (SINGH et al., 2008).

A presença do vírus EBV em alguns casos de amostras com alto grau de lesão intraepitelial nas células, pode ser devido à sua fase latente de infecção em fases de displasia epitelial, o que poderia ter um papel importante no desenvolvimento das lesões, como no ensaio realizado por KIKUCHI e colaboradores (KIKUCHI et al., 2015). Apesar de sua importância clínica e oncogênica, em nossa análise não houve uma observação significativa da presença do EBV nas amostras histológicas através dos testes com IHC. Sugere-se que isso seja devido à sua preferência por infectar linfócitos B e estabelecer uma infecção persistente nesse tipo celular, em células epiteliais seria uma infecção menos eficiente (ONNIS et al., 2012). Dessa forma, ainda é necessária uma elucidação do papel do EBV no processo de desenvolvimento das lesões do colo uterino.

Os resultados obtidos necessitam de verificação, pois foram encontradas algumas dificuldades com o manuseio das amostras, devido à antiguidade das mesmas e suas conseqüentes debilidades, como a rigidez do material, secções em condições inconstantes, secas e quebradiças, com conseqüente perda de material para análise adequada.

ANEXO

<i>LAUDO</i>	<i>DIAGNÓSTICO</i>	<i>IDADE</i>
B07_55	CONTROLE	37
B07_73	CONTROLE	44
B03_5595A	CONTROLE	45
B07_603	CONTROLE	51
B07_972	CONTROLE	52
B07_1483	CONTROLE	45
B07_1495	CONTROLE	35
B03_815B	NIC I	53
B03_815	NIC I	44
B03_5012	NIC I	41
B07_639	NIC I	62
B03_5697A	NIC I	57
B03_9960	NIC I	43
B07_1130	NIC I	54
B07_1358	NIC I	39
B07_529	NIC I	49
B07_1767	NIC I	55
B07_3924	NIC I	39
B07_1484	NIC I	52
B03_1836C	NIC II	63
B07_900	NIC II	42
B03_8201	NIC II	51
B03_8483	NIC II	38
B07_521	NIC II	39
B03_10087	NIC II	47
B07_11110A	NIC II	60
B03_11527	NIC II	55
B04_13578	NIC III	62
B05_10382	NIC III	43
B05_15735	NIC III	56
B06_8958E	NIC III	60
B07_815B	NIC III	40
B03_8016	NIC III	51
B03_10923	NIC III	49
B07_4259	NIC III	46
B07_4640	NIC III	31
B07_4687	NIC III	52
B07_5238	NIC III	55
B07_6285	NIC III	62
B07_6288	NIC III	53
B07_6337	NIC III	53
B07_6339	NIC III	45
B07_6593	NIC III	56
B07_6762	NIC III	61
B07_7016	NIC III	46
B07_7609	NIC III	57

B07_8002	NIC III	53
B07_8018	NIC III	63
B07_8156E	NIC III	45
B07_9193	NIC III	61
B07_9504	NIC III	56
B07_9707	NIC III	57
B07_9708	NIC III	44
B07_9803	NIC III	49
B07_10383	NIC III	48
B07_10458	NIC III	50
B07_11110C	NIC III	48
B07_11212	NIC III	42
B07_17262	NIC III	53
B07_17433	NIC III	59

8. CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

A patologia do câncer cervical está associada com a infecção e inflamação pelo HPV. Foi proposto que a influência de outros fatores e a co-infecção com o vírus EBV poderiam aumentar a progressão das lesões do câncer do colo uterino. Neste estudo, foi observado que há uma influência causada por esses fatores na progressão das lesões do câncer de colo uterino, ainda que pequena. Existe uma taxa significativa que correlaciona a infecção do HPV com a expressão da proteína MMP-7, sendo observada uma marcação atenuada no ensaio de imunohistoquímica nas células do tecido epitelial e conjuntivo. Ainda existe muito a ser avaliado na correlação desses fatores com o desenvolvimento das lesões, contudo é sabido por esse estudo que a expressão da MMP-7 é relevante na progressão da doença.

9. REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

ABDULKARIM B., SABRI S., DEUTSCH E., CHAGRAOUI H., MAGGIORELLA L., THIERRY J., ESCHWEGE F., VAINCHENKER W., CHOUAIB S., BOURHIS J., *Antiviral agente Cidofovir restores p53 function and enhances the radiosensitivity in HPV-associated cancers*. *Oncogene* (2002) 21, 2334-2346.

ADACHI Y., YAMAMOTO H., ITOH F., HINODA Y., OKADA Y., IMAI K. *Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers*. *Gut* (1999) 45, 252-258.

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Facts & Figures 2016*. Atlanta: American Cancer Society; (2016).

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cervical Cancer Prevention and Early Detection 2016*. Atlanta: American Cancer Society; (2016).

ANDERSON L., O'RORKE M., JAMISON J., WILSON R., GAVIN A.; *HPV Working Group members: Prevalence of human papillomavirus in women attending cervical screening in the UK and Ireland: new data from Northern Ireland and a systematic review and meta-analysis*. *J Med Virol*. (2013), 85, 295–308.

ASCHER SM., JHA RC., REINHOLD C., *Benign myometrial conditions: leiomyomas and adenomyosis*. *Top Magn Reson Imaging*. (2003) 14(4), 281-304.

ATTAYEK P. J., HUNSUCKER S. A., WANG Y., SIMS C. E., ARMISTEAD P. M., ALLBRITTON N. L. *Array-Based Platform To Select, Release, and Capture Epstein-Barr Virus-Infected Cells Based on Intercellular Adhesion*. *Analytical Chemistry* (2015).

BANKS L., SPENCE P., ANDROPHY E., HUBBERT N., METLASHEWSKI G., MURRAY A., CRAWFORD L. *Identification of Human Papillomavirus*

Type 18 E6 Polypeptide in Cells Derived from Human Cervical Carcinomas.
J. gen. Virol. (1987) 68, 1351-1359.

BEHERA M, COUCHMAN G, WALMER D, PRICE TM. *Mullerian agenesis and thrombocytopenia absent radius syndrome: a case report and review of syndromes associated with Mullerian agenesis.* Obstet Gynecol Surv. (2005) Jul. 60(7), 453-61.

BERNARDES, A. *Anatomia Cirúrgica do Aparelho Genital Feminino.* Permanyer Portugal. (versão eletrônica). (2011). Consultado em 24 de fevereiro de 2016 em: http://www.fspog.com/fotos/editor2/cap_01.pdf

BERTON A., SELVAIS C., LEMOINE P., HENRIET P., COURTOY P. J., Marbaix E., Emonard H., Binding of matrilysin-1 to human epithelial cells promotes its activity. Cellular and Molecular Life Sciences (2007) 64, 610-620.

BOUDREAU A., VAN'T VEER L. J.; *An "elite hacker": breast tumors exploit the normal microenvironment program to instruct their progression and biological diversity.* Cell Adhesion & Migration, v.6, (2012) p.236-248.

BOUNTRIS P., HARITOU M., POULIAKIS A., KARAKITSOS P., KOUTSOURIS D. A Decision Support System based on an Ensemble of Random Forests for Improving the Management of Women with Abnormal Findings at Cervical Screening. (2015).

BRASIL. *Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer [Internet]. Atlas de mortalidade por câncer.* Rio de Janeiro (RJ): INCA; (2011). [citado 2014 Abr 23]. Disponível em: <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>

CAMPION E. M., HAKIMJAVADI R., LOUGHRAN S. T., PHELAN S., SMITH S. M., D'SOUZA B. N., TIERNEY R. J., BELL A I., CAILL P. A., WALLS D. *Repression of the Proapoptotic Cellular BIK/NBK Gene by Epstein-Barr*

Virus Antagonizes Transforming Growth Factor β 1-Induced B-Cell Apoptosis. Journal of Virology Vol. 88 N° 9, (2014), p. 5001-5013.

CHANG B., KIM J., JEONG D., JEONG Y., JEON S., JUNG S., YANG Y., KIM K. I., LIM J. S., KIM C., LEE M. S. *Klotho inhibits the capacity of cell migration and invasion in cervical cancer.* Oncology Reports (2012), 28, 1022-1028.

COLLINS S. I., CONSTANDINO-WILLIAMS C., WEN K., YOUNG L. S., ROBERTS S., MURRAY P. G., WOODMAN C. B.; (2009). *Disruption of the E2 gene is a common and early event in the natural history of cervical human papillomavirus infection: a longitudinal cohort study.* Cancer. Res. 69 (9), 3828-3832.

DAVIDSON B., STAVNES H. T., HELLESYLT E., HAGER T., ZEPPA P., PINAMONTI M., WOHLSCHLAEGER J. *MMP-7 is a highly specific negative marker for benign and malignant mesothelial cells in serous effusions.* Human Pathology (2015).

DAVIDSON B., TROPE C. G., REICH R.; *The role of the tumor stroma in ovarian cancer.* Frontiers in Oncology. (2014), Volume 4.

DAWSON C.W., PORT R.J., YOUNG L.S. *The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC).* Semin Cancer Biol, (2012) 22, 144–153.

FINGLETON B., POWELL W. C., CRAWFORD H. C., COUCHMAN J. R., MATRISIAN L. M. *A rat onoclonal antibody that recognizes pro- and active MMP-7 indicates polarized expression in vivo.* Hybridoma (Larchmt 2007); 26(1).

FULLÁR A., DUDÁS J., OLÁH L., HOLLÓSI P., PAPP Z., SOBEL G., KARÁSZI K., PAKU S., BAGHY K., KOVALSZKY I. *Remodeling of extracellular matrix by normal and tumor-associated fibroblasts promotes cervical cancer progression.* BMC Cancer (2015) 15, 256.

GAUR N, GANDHI J, ROBERTSON ES, VERMA SC, KAUL R. *Epstein-Barr virus latent antigens EBNA3C and EBNA1 modulate epithelial to mesenchymal transition of cancer cells associated with tumor metastasis.* Tumour Biol. (2014).

HENG Y. J., DI QUINZIO M. K. W., LIONG S., PERMEZEL M., RICE G. E., GEORGIU H. M. *Temporal Investigation of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Cervicovaginal Fluid in Late Pregnancy and Labor.* Reproductive Sciences (2012) 19(1) 55-63.

HERFS M, YAMAMOTO Y, LAURY A, WANG X, NUCCI MR, MCLAUGHLIN-DRUBIN ME, MÜNGER K, FELDMAN S, MCKEON FD, XIAN W, CRUM CP. *A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer.* Proc Natl Acad Sci U S A. (2012) 109(26), 10516-21.

HERFS M., HERRAN C. P., HOWITT B., LAURY A., NUCCI M. R., FELDMAN S., JIMENEZ C. A., McKEON F. D., CRUM C. P. *Cervical squamocolumnar junction-specific markers define distinct, clinically relevant subsets of low-grade squamous intraepithelial lesions.* Am. J. Surg. Pathol, (2013); 37(9), 1311-1318.

HIRASHITA T., IWASHITA Y., OHTA M., KOMORI Y., EGUCHI H., YADA K., KITANO S.; *Expression of Matrix Metalloproteinase -7 is an Unfavorable Prognostic Factor in Intrahepatic Cholangiocarcinoma.* J. Gastrointest Surg (2012) 16:842-848

HYNES R. O., NABA A.; *Overview of the matrisome—An inventory of extracellular matrix constituents and functions.* Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, (2012) v. 4, p. a004903.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Acessado em 20/01/2016: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>

JACOB A., PREKERIS R. *The regulation of MMP targeting to invadopodia during cancer metastasis*. Cell and Developmental Biology. (2015), Vol. 3. Article 4.

JEMAL A, SIEGEL R, XU J, WARD E: *Cancer statistics, 2010*. CA Cancer J Clin (2010) 60(5), 277-300.

JOHNSON P. R., BURGESS J. K., UNDERWOOD P. A., PONIRIS M. H., TAMM M., GE Q., ROTH M., BLACK J. L; *Extracellular matrix proteins modulate asthmatic airway smooth muscle cell proliferation via an autocrine mechanism*. J. Allergy Clin Immunol (2004) 113, 690-6.

JUNQUEIRA L. C., CARNEIRO J. *Histologia Básica* 9ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S. A., (1999)

KAHLA S., OUESLATI S., ACHOUR M., KOCHBATI L., CHANOUIFI M. B., MAALEJ M., OUESLATI R.; *Correlation between EBV co-infection and HPV16 genome integrity in Tunisian cervical cancer patients*. Brazilian Journal of Microbiology (2012) 744-753.

KHENCHOUCHE A., SADOUKI N., BOUDRICHE A., HOUALI K., GRABA A., OOKA T., BOUGUERMOUH A.; *Human Papillomavirus and Epstein-Barr virus co-infection in Cervical Carcinoma in Algerian women*. Virology Journal (2013) 10, 340.

KESSLER I. *Cervical cancer: social and sexual correlates*. In R. Peto and H. Zur Hausen (eds). Viral etiology of cervical cancer, Cold spring Harbor, New York (1986) pp.55-64.

KIKUCHI K., NOGUCHI Y., RIVERA M. W. G. N., HOSHINO M., SAKASHITA H., YAMADA T., INOUE H., MIYAZAKI Y., NOZAKI T., LÓPEZ B. S. G., IDE F., KUSAMA K. *Detection of Epstein-Barr virus genome and latent infection gene expression in normal epithelia, epithelial dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity* (2015) Tumor Biol.

KOBAYASHI A., DARRAGH T., HERNDIER B., ANASTOS K., MINKOFF H., COHEN M., YOUNG M., LEVINE A., GRANT L. A., HYUN W., WEINBERG V., GREENBLATT R., SMITH-McCUNE K. *Lymphoid Follicles are Generated in High-Grade Cervical Dysplasia and have Differing Characteristics Depending on HIV Status*. American Journal of Pathology (2002) Vol. 160, N° 1.

Lawson J. S., Glenn W. K., Heng B., Ye Y., Tran B., Lutze-Mann L., Whitaker N. J. *Koilocytes indicate a role for human papilloma virus in breast cancer*. British Journal of Cancer (2009) 101, 1351-1356.

LENH H.; VILLA L.L.; MARZIONA F.; HILGARTH M.; HILLEMANS H.; SAUER G.; *Physical State and biological activity of Human Papilloma virus lesions of the female genital tract*. J. Gen. Virol., (1988) 69, 187-196.

LESNIKOVA I.; *p16 as a diagnostic marker of cervical neoplasia: a tissue microarray study of 796 archival specimens*. Diagn Pathol (2009) v.4, p.22.

LIU Y., LU Z., XU R., KE Y. *Comprehensive mapping of the human papillomavirus (HPV) DNA integration sites in cervical carcinomas by HPV capture technology*. (2015) Oncotarget.

LÓPEZ F., LLORENTE J. L., OVIEDO C. M., VIVANCO B., MARCOS C. A., GARCIA-INCLÁN C., SCOLA B., HRMSEN M. A., *Gene Amplification and Protein Overexpression of EGFR and ERBB2 in Sinonasal Squamous Cell Carcinoma*. Cancer (2012).

LORENZETTI M. A., MATTEO E. D., GASS H., VAZQUEZ P M., LARA J., GONZALEZ P., PRECIADO M. V., CHABAY P. A. *Characterization of Epstein Barr Virus Latency Pattern in Argentine Breast Carcinoma*. Plos One (2010) Vol 5.

MAKINEN L. K., HAYRY V., HAGSTROM J., SORSA T., SANTOS F.P., SANTTI H. K., HAUKKA J., MAKITIE A. A., HAGLUND C., ATULA T. *Matrix*

metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-25 in oral tongue squamous cell carcinoma. Head & Neck (2014).

MARINHO-DIAS J., RIBEIRO J., MONTEIRO P., LOUREIRO J., BALDAQUE I., MEDEIROS R., SOUZA H.; *Characterization of Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus Infection in Cervical Lesions in Portugal.* Journal of Medical Virology (2013) 85, 1409-1413.

McGUIRE J. K., HARJU-BAKER S., RIMS C., SHEEN J. H., LIAPIS H. *Matrilysin (MMP-7) Inhibition of BMP-7 Induced Renal Tubular Branching Morphogenesis Suggests a Role in the Pathogenesis of Human Renal Dysplasia.* Journal of Histochemistry & Cytochemistry (2012) 60(3) 243-253.

MIYATA Y, IWATA T, OHBA K, KANDA S, NISHIKIDO M, KANETAKE H: *Expression of matrix metalloproteinase-7 on cancer cells and tissue endothelial cells in renal cell carcinoma: prognostic implications and clinical significance for invasion and metastasis.* Clin Cancer Res (2006), 12(23), 6998-7003.

MOODY CA, LAIMINS LA: *Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation.* Nat Rev Cancer (2010), 10(8), 550-560.

MOSCICKI AB, SHIBOSKI S, HILLS NK, POWELL KJ, JAY N, HANSON EN, MILLER S, CANJURA-CLAYTON KL, FARHAT S, BROERING JM. *Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women.* Lancet (2004), 364(9446), 1678-1683.

MYLONA E., KAPRANOU A., MAVROMMATIS J., MARKAVI S., KERAMOPOULOS A., NAKAPOULOU L. *The multifunctional role of the immunohistochemical expression of MMP-7 in invasive breast cancer.* Departments of Pathology, Medical School of Athens University, Alexandra Hospital, Athens, Greece (2005) APMIS 113, 246-55.

Okamoto Y., Tanaka Y. O., Nishida M., Tsunoda H., Yoshikawa H., Itai Y.. *MR Imaging of the Uterine Cervix: Imaging-Pathologic Correlation*. Radio Graphics (2003) Vol. 23 Number 2.

OMAR A. A. H., HAGLUND C., VIROLAINEN S., HAYRY V., ATULA T., KONTIO R., SALO T., SORSA T., HAGSTROM J. *MMP-7, MMP-8 and MMP-9 in oral and cutaneous squamous cell carcinomas*. Oral and Maxillofacial Pathology (2015) Vol. 119 Nº 4.

ONNIS A., NAVARI M., ANTONICELLI G., MORETTINI F., De FALCO G., MANNUCI S., VIGORITO E., LEONCINI L. *Epstein-Barr nuclear antigen 1 induces expression of the cellular microRNA has-miR-127 and impairing B-cell differentiation in EBV-infected memory B cells. New insights into the pathogenesis of Burkitt lymphoma*. Blood Cancer Journal (2012) 2, 2044-5385/12

PHAETON R., WANG X. G., EINSTEIN M. H., GOLDBERG G. L., CASADEVALL A., DADACHOVA E. *The influence of proteasome inhibitor MG132, external radiation and unlabeled antibody on the tumor uptake and biodistribution of ¹²⁵I-labeled anti-E6 C1P5 antibody in cervical cancer in mice*. Cancer (2010) 116(4), 1067-1074.

PINHEIRO J. J. V.; *Estudo imuno-histoquímico e zimográfico das metaloproteinases da matriz 1, 2 e 9 no ameloblastoma/immunohistochemical and zymographic study of matrix metalloproteinases 1,2 and 9 in ameloblastoma* [Monografia para obtenção do grau de Doutor]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP (2002).

RODRIGUES F. R., MIRANDA N. L., FONSECA E. C., PIRES A. R. C., DIAS E. P.; *Investigation of the LMP1 EBV and co-infection by HPV in genital lesions of patients infected or not by HIV*. J. Bras. Patol. Med. Lab. (2010) V. 46 nº 5, p. 415-420.

SICA G. S., FIORANI C., STOLFI C., MONTELEONE G., CANDI E., AMELIO I., CATANI V., SIBIO S., DIVIZIA A., TEMA G., IACULLI E., GASPARI A. L.; *Peritoneal expression of matrilysin helps identify early post-operative recurrence of colorectal cancer*. Oncotarget, Advance Publications (2014)

SIER C. F. M., HAWINKELS L. J. A. C., ZIJLMANS H. J. M. A. A., ZUIDWIJK K., MULLER E. S. M. J., FERREIRA V. HANEMAAIJER R., STAPEL A. A. M., KENTER G. G., VERSPAGET H. W., GORTER A. *Endothelium specific matrilysin (MMP-7) expression in human cancers*. Matrix Biology (2008) 27, 267-271.

SINGH H., JAIN M., MITTAL B. *MMP-7 (-181A>G) promoter polymorphisms and risk for cervical cancer*. Gynecologic Oncology (2008) 110, 71-75.

SIRIANNI N., HA P. K., OELKE M., CALIFANO J., GOODING W., WESTRA W., WHITESIDE T. L., KOCH W. M., ACHNECK J. P., DELEO A., FERRIS R. L. *Effect of Human Papillomavirus-16 Infection on CD8+ T-Cell Recognition of a Wild-Type Sequence p53 Peptide in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck*. Clinical Cancer Research. (2004) Vol. 10, 6929-6937.

SOUTHERN S.A.; HERRINGTON C.S.; *Molecular events in uterine cervical cancer*. Sex. Transm. (1998) Inf. 74:101-109.

SOUZA, R. T. P.; *Histomorfometria, Apoptose (Bcl-2 e Bax) e Marcador de proliferação celular Ki-67 em neoplasias intraepiteliais do colo uterino*. Dissertação em Patologia (2011) Belo Horizonte.

SOUZA A. P., LINE S. R. P.; *The biology of matrix metalloproteinases*. Rev Fac Odontol Bauru (2002), 10(1), p.1-6.

SURENDRAN K., SIMON T. C., LIAPIS H., MCGUIRE J. K. *Matrilysin (MMP-7) expression in renal tubular damage: Association with Wnt4*. *Kidney International* (2004) Vol. 65, pp. 2212-2222.

SZKARADKIEWICZ A. K., KARPINSKI T. M., SZKARADKIEWICZ A.; *Effect of novobiocin on the viability of human gingival fibroblasts (HGF-1)* *BMC Pharmacology and Toxicology* (2014) 15:25.

SZOSTEK S., ZAWILINSKA B., KOPEC J., KOSZ-VNENCHAK-KOSZ M.; *Herpesviruses as possible cofactors in HPV-16-related oncogenesis*. *Acta Biochimica Polonica* (2009) Vol. 56 N° 2, 337-342.

THOMISON J, 3RD, THOMAS LK, SHROYER KR: *Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma*. *Hum Pathol* (2008), 39(2), 154-166.

THOMPSON S., MESSICK T., SCHULTZ D. C., REICHMAN M., LIEBERMAN P. M., *Development of a High-Throughput Screen for Inhibitors of Epstein-Barr Virus EBNA1*. *J. Biomol Screen.* (2010) October; 15(9), 1107-1115.

TSANG C. M., TSAO S. W. *The role of Epstein-Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma*. *Virologia Sinica* (2015) 30(2), 107-121.

Tsang CM, Yip YL, Lo KW, et al. *Cyclin D1 overexpression supports stable EBV infection in nasopharyngeal epithelial cells*. *Proc Natl Acad Sci USA* (2012) 109, E3473–3482.

TSAO S. W., TSANG C. M., TO K. F., LO K. W. *The role of Epstein-Barr virus in epithelial malignancies*. *Journal of Pathology* (2015) 235, 323-333.

VINOKUROVA S., WENTZENSEN N., KRAUS I., KLAES R., DRIESCH C., MELSHEIMER P., KISSELJOV F., DURST M., SCHNEIDER A., DOEBERITZ M. K. *Type-Dependent Integration Frequency of Human Papillomavirus Genomes in Cervical Lesions*. *Cancer Res* (2008) 68:(1).

WALBOOMERS J. M. M., JACOBS M. V., MANOS M. M., BOSCH F. X., KUMMER J. A., SHAH K. V., SNIJDERS P. J. F., PETO J., MEIJER C. J. L. M., MUNOZ N. *Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. Journal of Pathology (1999) 189, 12-19.

WARREN C. J., GRIFFIN L. M., LITTLE A. S., HUANG I., FARZAN M., PYEON D. *The Antiviral Restriction Factors IFITM1, 2 and 3 do not Inhibit Infection of Human Papillomavirus Cytomegalovirus and Adenovirus*. Plos One (2014) Vol 9.

WOESSNER J. F. Jr. *The matrix metalloproteinase family*. In: Mechan RP, Parks WC, editors. Matrix metalloproteinase. New York: Academic (1998). p. 1-14.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/>> Acesso: 22/10/2014.

WU S., LU S., TAO H., ZHANG L., LIN W., SHANG H., XIE J., *Correlation of Polymorphism of IL-8 and MMP-7 with Occurrence and Lymph Node Metastasis of Early Stage Cervical Cancer*. J. Huazhong Univ. Sci. Technol [Med. Sci] (2011) 31(1), 114-119.

WU J., GUAN X., ZHANG K., LI Y, T., BAI P., WU J., *A/G polymorphism of matrix metalloproteinase 7 gene promoter region and cancer risk: A meta-analysis*. Biomedical Reports (2013) 1, 792-796.

WU J., GUAN X., ZHANG K., LI Y. T., BAI P., WU J., *A/G polymorphism of matrix metalloproteinase 7 gene promoter region and cancer risk: A meta-analysis*. Biomedical Reports (2013) 1, 792-796.

XIE E., PIAO L., BULLOCK B. N., SMITH A., SU T., ZHANG M., TEKNOS T. N., ARORA P. S., PAN Q. *Targeting HPV16 E6-p300 interaction reactivates*

p53 and inhibits the tumorigenicity of HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma. Oncogene (2014) 33(8), 1037-1046.

XIE B., ZHANG Z., WANG H., CHEN Z., WANG Y., LIANG H., YANG G., YANG X., ZHANG H. *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).*

YURCHENCO P. D. *Basement Membranes: Cell Scaffoldings and Signaling Platforms. Cold Spring Harb Perspect Biol (2011).*

ZHANG Y., FAN S., MENG Q., MA Y., KATIYAR P., SCHLEGEL R., ROSEN E. M. *BRCA1 interaction with Human Papillomavirus Oncoproteins. The Journal of Biological Chemistry. (2005) Vol. 280, N° 39, 33165-33177.*

ZUR HAUSEN H., *Papillomaviruses and Cancer: From Basic Studies to Clinical Application. Nature (2002).*