**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**Modulação do perfil proteolítico em lesões pré-malignas de colo do útero em
pacientes infectadas com HPV**

RODRIGO ALBERTO ALVES DA SILVA

RIBEIRÃO PRETO

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Modulação do perfil proteolítico em lesões pré-malignas de colo do útero em
pacientes infectadas com HPV**

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:

Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales

RIBEIRÃO PRETO

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Silva, Rodrigo Alberto Alves da

Modulação do perfil proteolítico em lesões pré-malignas de colo do útero em pacientes infectadas com HPV. Ribeirão Preto, 2020.

91 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Sales, Katiuchia Uzzun.

1. Serino-Protease. 2. Lesão intraepitelial escamosa de alto grau. 3. HPV.

Aluno: **Silva, Rodrigo Alberto Alves da**

Título: **Modulação do perfil proteolítico em lesões pré-malignas de colo do útero em pacientes infectadas com HPV**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular. Orientadora: Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes” **(Martin Luther King)**

DEDICATÓRIA

**A meus pais, Mário e Waldete, pilares da minha
formação.**

**À minha esposa, Ana Ruth, minha eterna
companheira e exemplo de vida.**

À sociedade brasileira.

AGRADECIMENTOS

A construção científica não é concretizada a partir do trabalho de apenas uma pessoa, mas sim da colaboração de um grupo. A ideia central de um projeto de pesquisa é como um diamante antes de sua lapidação. Para que este “diamante” saia do campo das ideias e torne-se precioso no campo da realidade prática, sua lapidação se faz necessária por várias mãos. Assim, a experiência, conhecimento e especialidade de cada pessoa envolvida em uma pesquisa faz com que esta seja bem-sucedida e aplicável ao seu fim. E nesta complexa rede de pessoas envolvidas na busca de conferir preciosidade ao “diamante”, é onde crescemos como cientistas e como pessoas. Por conta disso, não poderia me permitir esquecer de agradecer aos tantos que colaboraram nesta caminhada chamada Mestrado.

“Estamos na situação de uma criancinha que entra em uma imensa biblioteca, repleta de livros em muitas línguas. A criança sabe que alguém deve ter escrito aqueles livros, mas não sabe como. Não compreende as línguas em que foram escritos. Tem uma pálida suspeita de que a disposição dos livros obedece a uma ordem misteriosa, mas não sabe qual ela é”. **(Albert Einstein)**

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir estar vivo neste momento e ter me capacitado a passar por todos os momentos de minha vida, desde a mais intensa alegria vivida até ao mais espinhoso desafio enfrentado. *SOLI DEO GLORIA.*

Agradeço à minha família:

Aos meus pais, **Mário Alves da Silva** e **Waldete Aparecida Simões da Silva**, que mesmo demandando sacrifícios pessoais e dificuldades, não pouparam esforços e incentivos em minha educação e crescimento. Aos sólidos princípios de honestidade e respeito ao próximo presentes em minha criação e que levarei por toda minha vida. Ao grande exemplo de simplicidade que carregam no viver. A vocês eu devo muito e sempre os carregarei em meu coração.

Aos meus irmãos, **Mário Eduardo** e **Cássio Henrique**, por me incentivarem em meus estudos e participarem do meu amadurecimento como pessoa. Obrigado por todos os ensinamentos dentro do convívio entre irmãos.

À minha esposa e eterna companheira, **Ana Ruth Paolinetti Alves da Silva**, que sempre me proporciona apoio incondicional em momentos de difíceis decisões e me dá força para enfrentar os desafios proporcionados pela vida. Obrigado por ser um exemplo para mim. Um exemplo de vida cristã, de luta pelos objetivos, um exemplo de perseverança e de amor. Obrigado por acreditar em mim e me fazer acreditar mais no meu potencial. Sem mais, obrigado por estar ao meu lado. Haverá sempre um lugar especial para você em meu coração.

Por fim, agradeço aos meus avós, **Maria de Lourdes dos Santos Dinhane** e **José Alves da Silva** (*In Memoriam*), por me ensinarem, no viver de suas vidas, o significado da palavra humildade.

Meus agradecimentos especiais:

À minha orientadora, **Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales**, que abriu as portas de seu laboratório, ainda recém-formado na época, para a realização de meu mestrado. Obrigado por todas as sugestões, críticas e insights científicos neste projeto. Obrigado por ensinar que ciência é algo que se constrói com paciência. Agradeço por ter provido meios para que eu pudesse realizar a maior parte deste mestrado ao mesmo tempo em que trabalhava no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Seu suporte e incentivo foram essenciais nesta tomada de decisão. Por fim, obrigado pela confiança depositada em mim.

Agradeço aos docentes que se disponibilizaram a fazer parte da Banca Examinadora. Obrigado pelo tempo e atenção dedicados na avaliação deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Proteases e Biologia do Câncer:

Agradeço ao meu grande amigo **Bruno Belmonte Martinelli Gomes**, pelas incontáveis conversas e discussões científicas e não-científicas. Por ser mais que um amigo de longa data, mas um irmão e parceiro nas aventuras que a vida tem nos proporcionado desde o início da graduação em 2011 até o mestrado. Obrigado por ser um parceiro em todas as aventuras vividas em Ribeirão Preto. Obrigado por todos os conselhos, críticas e correções, brindando nossas conversas com sua genialidade objetiva.

Ao meu grande amigo **Gabriel Viliod Vieira**, que me ensinou a importância do diálogo sensato, calmo e amigável. Sempre mostrando em nossas conversas a possibilidade de opiniões divergentes dialogarem. Obrigado por esta grande amizade construída durante o mestrado. Você definitivamente é o exemplo de alguém que trabalha duro e se esforça ao máximo para realizar algo que se propôs. Obrigado por todos os ensinamentos.

Ao meu grande amigo **Márcio Hideki Kodama**, por sua humildade e contagiante felicidade. Sempre com um sorriso no rosto. Obrigado por todas as ótimas conversas acompanhadas de um delicioso café. Outra grande amizade que o mestrado me presenteou e confesso não conhecer tantas pessoas com um coração tão grande quanto o seu, meu amigo.

A vocês três, que fazem parte do 'Clube do Bolinha', foram tantas discussões em cima deste projeto, que sem sombra de dúvidas tenho que dizer que este projeto também é de vocês. Vocês com certeza farão muita falta em São Paulo.

Agradeço à minha amiga **Dra. Elaine Zayas Marcelino da Silva**, foram inúmeras vezes em que fui em busca de sua ajuda com várias perguntas e você sempre, de prontidão, se dispôs a me ajudar. Sua dedicação e foco em seus objetivos são realmente características a se espelhar.

À **Profa. Dra. Lara Maria Alencar Ramos Innocentini**, por todas as sugestões científicas para este trabalho nas reuniões semanais do laboratório.

À minha amiga **Márcia Gaião Alves**, pelo seu apoio constante durante este projeto e por sua imensurável ajuda. Sempre dando dicas em como melhorar a imuno-histoquímica.

Agradeço à **Carol Kobori**, por seu sempre solícito suporte científico e sua disposição em ajudar nos experimentos. Obrigado por todas as discussões científicas. Sua vasta experiência e olhar crítico para o projeto de fato contribuíram de maneira construtiva no meu mestrado.

Agradeço aos atuais alunos de Iniciação científica, **Juan, Mateus, Vitor** e aos demais alunos que já passaram pelo Laboratório de Proteases e Biologia do Câncer, pelo interesse demonstrado em aprender mais.

Agradeço Também:

À **Vani**, pelos serviços prestados em histologia. Todos estes ensinamentos eu levarei para a vida. Obrigado por sempre me apoiar durante este processo.

À Profa. **Dra. Silvana Quintana**, por possibilitar a ponte entre a pesquisa básica e os pacientes, assim sendo de grande contribuição neste trabalho.

À **Larissa Bastos**, pela sua disposição semanal na coleta de biópsias realizada no HCRP. Você também é parte desta história.

Aos meus colegas do **Laboratório de Fluídos Orgânicos e Laboratório de Urgência no HCRP**. Por toda a compreensão e apoio durante esta caminhada.

Agradeço à **Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)**, por toda a base educacional adquirida na graduação.

Ao **Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos**, por todo o aprofundamento educacional proporcionado durante esta pós-graduação.

À **Gabriela Bunhotto Zamoner**, por estar sempre disponível para atender os alunos com muita dedicação.

Por fim, mas não menos importante, à **FAPESP, FAEPA e CAPES**, por todo o apoio financeiro direcionado tanto para execução deste projeto, quanto para o pagamento de bolsa de estudo.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

RESUMO	21
ABSTRACT	24
INTRODUÇÃO	26
CÂNCER E CARCINOMA DE COLO DE ÚTERO	26
HPV E CARCINOGENESE	31
SERINO-PROTEASES E CARCINOGENESE	34
OBJETIVOS	41
Objetivo Geral	41
Objetivos Específicos	41
MATERIAL E MÉTODOS	43
1.Aspectos éticos.....	43
2. Participantes da Pesquisa.....	43
3. Obtenção de biópsias de colo do útero de pacientes	44
4. Processamento das biópsias e avaliação do grau da lesão	45
5. Imuno-histoquímica	47
6. Análise Estatística	51
RESULTADOS	53
1. Otimização das reações de imuno-histoquímica em tecido epitelial	53
2. Alteração na expressão de Matriptase, HAI-1 e HAI-2 em biópsias de colo de útero com lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL)	56
3. Alteração na expressão de KLK5 e KLK7 em biópsias de colo de útero com lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL)	59
4. O balanço entre a expressão da serino-protease e de seu respectivo inibidor apresenta correlação fraca entre Matriptase:HAI-2 e KLK7:LEKTI em biópsias com características pré-neoplásicas	61
DISCUSSÃO	64
CONCLUSÕES.....	71

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXOS.....	87
Anexo I: Parecer de aprovação do projeto pelo Comitê de ética em Pesquisa do HCRP-USP.....	87
Anexo II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e para Guarda de Material Biológico – Pacientes Soronegativas para HIV Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e para Guarda de Material Biológico – Pacientes Soronegativas para HIV	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia e Histologia do Colo do Útero.....	28
Figura 2. Incidência e Mortalidade de Câncer de Colo do Útero.	30
Figura 3. Progressão Patológica da infecção por HPV.....	34
Figura 4. Via Proteolítica da Matriptase, Calicreínas 5 e 7 e seus Inibidores.....	39
Figura 5. Processamento das biópsias e avaliação do grau da lesão	46
Figura 6. Fluxograma ilustrativo dos métodos de quantificações.	50
Figura 7. Validação dos anticorpos para KLK5, KLK7, LEKTI, Matriptase, HAI-1 e HAI-2 em epitélio de pele	55
Figura 8. Alteração na expressão de Matriptase, HAI-1 e HAI-2 em biópsias de colo de útero com lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL)	58
Figura 9. Alteração na expressão de KLK5 e KLK7 em biópsias de colo de útero com lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL)	60
Figura 10. O balanço entre a expressão da serino-protease e de seu respectivo inibidor apresenta correlação fraca entre Matriptase:HAI-2 e KLK7:LEKTI em biópsias com características pré-malignas.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT – *Protein Kinase B*

AMIG - Ambulatório de Moléstias Infectocontagiosas em Ginecologia

BSA - *Bovine serum albumin*

CCU – Câncer de colo do útero

CUB - *C1r/C1s, urchin embryonic growth factor and bone morphogenetic protein-1*

DAB - *3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride*

DNA – *Ácido Desoxirribonucleico*

E1-E7 – *Early genes*

E2F – Genes Codificadores de Fatores de Transcrição

EGFR - Receptor do fator de crescimento epidérmico

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

GSK3 β - *Glycogen synthase kinase 3 beta*

H&E – Hematoxilina e eosina

HAI-1 - *Hepatocyte growth factor activator inhibitor-1*

HAI-2 - *Hepatocyte growth factor activator inhibitor-2*

HGF - *Hepatocyte Growth Factor*

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HPV - *Human papillomavirus*

HSIL – Lesão intraepitelial escamosa de alto grau/ *High Grade Squamous Intraepithelial Lesion*

IARC - Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

JEC – Junção escamo-colunar

K5 – Queratina 5

KLK5 – Calicreína 5

KLK7 – Calicreína 7

L1-L2 – *Late genes*

LDLA - *Low-density lipoprotein receptor class A*

LEKTI - *Lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor*

LSIL - Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau/ *Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion*

mTOR - *Mammalian target of rapamycin*

NF- κ B - *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NIC - Neoplasia intra-epitelial cervical

OMS - Organização Mundial de Saúde

p53 – *Tumor protein p53*

PAR-2 - Receptor Ativado por Proteases-2

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PI3K – Fosfatidilinositol trifosfato

pRb – *Retinoblastoma Protein/ Proteína do Retinoblastoma*

SEA - *Sea urchin sperm protein/enterokinase/agrin*

SIP1 - *Smad interacting protein 1*

ST14 - *Suppressor of tumorigenicity 14*

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

uPA – Ativador de plasminogênio tipo uroquinase/ *Urokinase plasminogen activator*

URR - regiões regulatórias *upstream*

RESUMO

RESUMO

SILVA, Rodrigo Alberto Alves da. Modulação do perfil proteolítico em lesões pré-malignas de colo do útero em pacientes infectadas com HPV. [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2020.

O carcinoma de colo do útero aparece, atualmente, como um problema de saúde pública devido a sua alta taxa de incidência e mortalidade no Brasil e no mundo. Em sua maioria, estes carcinomas são causados pela integração dos oncogenes do papilomavírus humano (HPV) ao DNA de células epiteliais do colo do útero, que passam por uma transformação gradual, de mucosa normal ao carcinoma. Dentre outros fatores, a desregulação na expressão de proteases contribui para a evolução do carcinoma e, muitas delas, contribuem para a iniciação tumoral, progressão tumoral, invasão de tecidos subjacentes e metástase. Como exemplo, a matriptase, uma serino-protease transmembrana traduzida do gene *ST14*, favorece a carcinogênese através da ativação das vias de sinalização de PI3K-Akt-mTOR e PAR2-NFkB. Este trabalho teve como objetivo principal analisar a modulação no perfil proteolítico de pacientes portadoras de lesões intraepiteliais de alto grau de colo do útero (HSIL) infectadas com HPV. Para tanto, foram utilizadas duas biópsias (uma de região epitelial normal e outra de HSIL), oriundas de 15 participantes, para avaliar o nível de expressão destas proteases e de seus inibidores, como HAI-1, HAI-2 e LEKTI, através da técnica de imuno-histoquímica. Foi observado, como resultado, um aumento significativo na expressão de matriptase, KLK5 e KLK7 nas lesões pré-malignas de colo do útero, assim como uma expressiva alteração de HAI-1 e HAI-2. Além disso, matriptase e seus inibidores apresentaram alteração no seu padrão de expressão, para um padrão difuso, em amostras HSIL. Ainda, foi avaliada correlação entre a expressão da protease e de seu inibidor cognato (Matriptase e HAI-1 ou HAI-2; KLK5 ou KLK7 e LEKTI). Porém, encontramos uma correlação fraca e não significativa, estatisticamente, para matriptase:HAI-2 e KLK7:LEKTI. Em conclusão, este trabalho contribui para o entendimento de que serino-proteases podem atuar na progressão para a carcinogênese, desde etapas iniciais, como a lesão pré-maligna. Ainda, este estudo é justificado pelo fato de estas serino-proteases estarem localizadas na membrana plasmática ou no ambiente extracelular

e, portanto, alvos de fácil acesso para futuras terapias e/ou marcadores de diagnóstico.

Palavras-chave: 1. Serino-Protease; 2. Lesão intraepitelial escamosa de alto grau; 3. HPV.

ABSTRACT

ABSTRACT

SILVA, Rodrigo Alberto Alves da. Modulation of proteolytic profile in premalignant cervical lesions from patients infected with HPV. [dissertation]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Ribeirão Preto Medical School; 2020.

Nowadays, cervical carcinoma is seen as a public health problem due to its high incidence and mortality rates in Brazil and worldwide. Most of these carcinomas are caused by the integration of human papillomavirus (HPV) oncogenes into the DNA of cervical epithelial cells, which undergo a gradual transformation from normal mucosa to invasive carcinoma. Among other factors, deregulation of protease expression contributes to carcinoma initiation, progression, invasion and metastasis. For instance, deregulation of matrilysin, a serine protease encoded by the *ST14* gene, favors carcinogenesis through the activation of PI3K-Akt-mTOR and PAR-2-NFκB signaling pathways. The main objective of this study was to analyze the modulation of proteolytic profile in 15 HPV-infected patients bearing high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL). For this, we have used immunohistochemistry staining for assessment of the expression level of these proteases and their inhibitors, such as HAI-1, HAI-2 and LEKTI. Results have shown a significant increase in the expression of matrilysin, KLK5 and KLK7 within premalignant cervical lesions, as much as an expressive alteration of HAI-1 and HAI-2. In addition, matrilysin and its inhibitors demonstrated to have an altered expression pattern, from membranous into a diffuse staining, in HSIL. Also, a weak and non-statistically significant correlation between matrilysin:HAI-2 and KLK7:LEKTI was found in HSIL. In conclusion, these data contribute to the understanding that serine proteases might have a role in the progression of cervical HSIL into carcinogenesis. Moreover, this study is justified for the proteases location in the plasma membrane or in the extracellular matrix and, therefore, easy targets and good candidates for future therapies and/or prognostic markers.

Key words: 1. Serine protease; 2. High Grade Squamous Intraepithelial Lesion (HSIL); 3. HPV.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

CÂNCER E CARCINOMA DE COLO DE ÚTERO

Câncer é uma doença de origem multifatorial conhecida pela diferenciação de uma célula normal em uma célula tumoral (Vogelstein et al., 1993). De acordo com Hanahan e colaboradores (2011), existem seis grandes características que definem uma célula como tumoral e a fazem capaz de disseminar para outros tecidos, dentre elas, a capacidade de resistir à morte celular, a manutenção da sinalização pró-proliferativa, a habilidade de escapar de inibidores de crescimento celular, a indução de angiogênese, a imortalidade e, por fim, a capacidade de invadir e gerar metástase. Juntamente com estes conceitos, estes e outros autores apontam para a expansão desta visão a outras duas características, como a capacidade de reprogramar ou modificar o metabolismo energético da célula normal para tumoral e ainda sua capacidade de evasão do sistema imunológico (Chen et al., 2012; Hall et al., 2013; Maeurer et al., 1996; Munn et al., 2002).

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, na sigla em inglês), gerida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), traz estimativas alarmantes quanto a esta doença. Ao todo, estima-se que, somente em 2018, o número de pessoas com câncer tenha aumentado em aproximadamente 18 milhões, enquanto as mortes em consequência de câncer tenham alcançado 9.6 milhões. Retirando as devidas diferenças geográficas e padrões de desenvolvimento humano, estima-se que 20% dos homens e mais de 16% das mulheres no mundo chegam a desenvolver câncer durante sua vida, dados estes que preocupam e servem como alerta aos olhos da comunidade científica (IARC-OMS, acessado em 29-10-19).

O colo do útero fica localizado na região inferior do útero e seu orifício cervical externo abre-se para a porção interna da vagina. Assim como o corpo do útero, ele é uma estrutura fibromuscular que mede aproximadamente 4 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro. O colo do útero é dividido em ectocérvix, mais externamente ao orifício cervical externo, e endocérvix, mais proximal e internamente ao orifício cervical externo (Figura 1A). Histologicamente, o colo do útero é majoritariamente revestido por dois tecidos epiteliais, o tecido epitelial pavimentoso estratificado não-queratinizado encontrado no ectocérvix e o tecido epitelial colunar simples (ou

epitélio glandular) encontrado no endocérnix. Este último possui uma única camada de células, sem presença de glicogênio e que revestem o canal cervical encontrando-se superiormente com o endométrio. O ectocérnix, por sua vez, é um epitélio composto de várias camadas com características próprias, sendo elas a camada basal e parabasal, às quais apresentam células com grande núcleo e escasso citoplasma, sendo as basais mitoticamente ativas. Há também as camadas de células intermediárias e superficiais, com volume nuclear diminuído e abundante citoplasma onde o glicogênio se faz presente (Figura 1B). O encontro dos dois epitélios do colo do útero acontece na região chamada de Junção escamo-colunar (JEC) (Figura 1C) (Sankaranarayanan et al., 2004).

Figura 1. Anatomia e Histologia do Colo do Útero. O útero é anatomicamente dividido em corpo e colo (**A**). Este último possui dois tipos de revestimento em diferentes regiões, o **ectocérvix**, em que consiste de epitélio estratificado pavimentoso (**B**) e **endocérvix**, revestido por epitélio simples colunar. O encontro destas duas regiões epiteliais se faz na junção escamo-colunar (JEC) (**C**). Imagens retiradas e modificadas de: Netter, F. (2011) e IARC – OMS (2019).

O câncer de colo do útero (CCU) inicia-se a partir da transformação das células epiteliais que revestem o colo uterino. O câncer originado da célula epitelial também é conhecido como carcinoma (*The Cell: Molecular Approach* – 2000). Nesta patologia, estas células geralmente são modificadas de maneira gradual, evoluindo de um estado normal, para células pré-cancerosas e, finalmente, células cancerosas (*The Cell: Molecular Approach* – 2000; Ryan et al., 2016). No colo do útero, há dois grandes grupos de carcinoma: (i) o carcinoma de células escamosas do colo do útero, que se desenvolve a partir de células metaplásicas na zona de transformação da JEC, sendo o tipo histológico diagnosticado em aproximadamente 90% dos casos; e (ii) o adenocarcinoma, que ocorre em aproximadamente 10% dos casos e acontece nas células produtoras de muco das glândulas presentes na região endocervical do colo do útero (OMS – *Cervical cancer*, 2018).

Estatísticas globais estimam que o CCU é o quarto mais comum entre as mulheres (Figura 2 A, painel à esquerda, quadrado vermelho), atingindo cerca de 569.847 novos casos e sendo a causa de mortalidade de 311.365 mulheres, em 2018 (Figura 2 B) (Bray et al., 2018; IARC - OMS - 2018). Sabe-se ainda que países subdesenvolvidos e em desenvolvimento possuem um índice mais elevado desta doença comparados a países desenvolvidos, fato explicado pela deficiência no rastreamento desta neoplasia que possibilita diagnosticar as lesões pré-malignas do epitélio do colo uterino (LaVigne et al., 2017). No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o CCU é a terceira neoplasia maligna mais comum entre as mulheres, suas estimativas apontam para aproximadamente 16.370 novos casos (Figura 2 A, painel à direita, quadrado vermelho) e 5.430 mortes, no ano de 2018 (Figura 2 B) (INCA, 2018).

Figura 2. Incidência e Mortalidade de Câncer de Colo do Útero. Dados que registram a incidência de câncer de colo do útero no mundo e no Brasil, indicando-o como o quarto câncer mais comum globalmente e o terceiro mais comum entre as mulheres brasileiras **(A)**. Taxas de mortalidade de câncer de colo do útero no mundo e no Brasil **(B)**. Figura elaborada a partir de dados atualizados do INCA (2018) e IARC-OMS (2018).

Estudos baseados em populações têm mostrado ainda que CCU, juntamente com câncer de mama, demonstra ser um tipo de câncer muito comum em jovens adultos entre 20-39 anos, em termos de incidência e mortalidade (Benard et al., 2012; Patel et al., 2012; Fidler et al., 2017). Ainda, é um dos maiores responsáveis por aumentar a taxa de câncer em jovens adultos no mundo, resguardadas as variações geográficas e de desenvolvimento humano (Fidler et al., 2017). Por conta disto, o câncer de colo do útero serve como ponto de partida para a busca de mais conhecimento e desenvolvimento técnico-científico, no sentido de prevenção,

estabelecimento de vacinas e tratamentos mais específicos para esta patologia (Fidler et al., 2017).

HPV E CARCINOGENESE

Diversos fatores podem influenciar no desenvolvimento do CCU, como por exemplo, tabagismo, imunossupressão, número de parceiros sexuais, entre outros. Porém, o mais importante fator de risco é a infecção pelo HPV (Almonte et al., 2008). A integração dos oncogenes virais do HPV no genoma das células epiteliais da mucosa do colo uterino levam à transformação destas células, que evoluem através de três estágios pré-malignos (culminando no carcinoma *in situ*) antes de se diferenciarem em carcinoma invasivo (Shukla et al., 2014). Estes estágios, onde a célula possui características de pré-malignidade, são denominados de Neoplasia Intraepitelial Cervical I, II e III (NIC I, II e III; respectivamente) (Schiffman et al., 2013). Ainda, mais recentemente, estas lesões foram agrupadas em: (i) lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL) para NIC I; e (ii) lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL) para NIC II e III (Figura 3) (Doorbar, J. 2006; Darragh et al., 2012).

Atualmente já foram identificados mais de 120 tipos de HPV, sendo que 45 podem infectar a região genital (de Villiers et al., 2004; Forman et al., 2012). Estes tipos virais são classificados, de acordo com sua capacidade de induzir transformação celular, em HPV de baixo risco oncogênico, cujos principais representantes são o 6, 11, 40, 42 e 55; e os de alto risco oncogênico, representados pelos tipos 16, 18, 31, 33, 35 e 39 (Bernard et al., 2010). Aproximadamente 70% das pacientes com CCU possuem infecção por HPV 16 e 18, tornando estes subtipos os mais frequentemente encontrados (Goffin et al., 2006; Smith et al., 2007; Bouvard et al., 2009).

O HPV possui um DNA circular de dupla fita com tamanho aproximado de 8000 pares de base. Seu genoma é dividido em regiões precoce (onde se encontram as fases de leitura aberta para os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e tardia (para os genes L1 e L2) (Figura 3) (Danos et al., 1982; Zheng et al., 2006). As proteínas tardias L1 e L2 desempenham um importante papel na formação do capsídeo viral; e as proteínas codificadas pela região precoce (região dos genes E) possuem a função de regulação gênica do HPV, desempenhando papel na

regulação da replicação e transcrição do genoma viral, regulação de ciclo celular, controle de apoptose e sinalização celular, modificação estrutural da célula infectada e outros (Doorbar et al., 1987). Mais especificamente, a estruturação do capsídeo viral se dá devido a formação de capsômeros, que são estruturas em pentâmeros formadas a partir de monômeros de L1 juntamente com moléculas de L2 na estrutura do capsídeo (Buck et al., 2008). Ainda, L1 está associada à entrada viral na célula, pois através da interação da partícula viral com proteoglicanas de heparan sulfato, a enzima calicreína 8 participa na degradação de L1, assim facilitando a exposição de L2 e permitindo a entrada de material genético viral na célula (Cerqueira et al., 2015).

Do mesmo modo há diferentes proteínas precoces, dentre elas E1 destaca-se pelo recrutamento da DNA polimerase e por sua atuação como uma helicase, abrindo a fita para replicação do DNA. Com relação a E2, além de seu importante papel juntamente com a helicase E1 no recrutamento da maquinaria celular de replicação de DNA, ela tem demonstrado interagir também com L1, possibilitando tanto um aumento de ativação transcricional quanto atuando em eventos tardios do ciclo viral (Siddiqi et al., 2015). Além disso, E2 possui uma atuação importante como regulador da transcrição de E6 e E7, assim possuindo um alto impacto no nível de expressão destas proteínas virais (Bernard et al., 2002). Já E4, por sua vez, tem sido evidenciada como uma proteína que possui influência na síntese viral e na alteração da amplificação do genoma, além do fato de ser entendida como um indicador de incorporação de DNA do HPV pelo hospedeiro, visto sua fácil visualização por imunofluorescência (Wilson et al., 2007; Chow et al., 2009). A E5 desempenha um papel no crescimento celular, pois ela altera a transdução de sinais do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Kivi et al., 2008). Entretanto, de importância fundamental na transformação maligna de células epiteliais, destacam-se as proteínas E6 e E7, cujas funções estão em descontrolar a taxa de crescimento celular e prejudicar a apoptose (DeFilippis et al., 2003; Faridi et al., 2011). A oncoproteína E6 interage com vários alvos diferentes, mas a mais conhecida e estudada é a proteína p53, uma das principais proteínas supressoras de tumor que, frente ao dano no DNA, desencadeia a parada do ciclo celular e induz a apoptose celular (Lechner et al., 1994). E6 consegue inibir a ação da proteína p53 através de degradação desta pela via proteolítica da ubiquitina – proteassoma

(Lechner, et al., 1994; Massimi, et al., 2008). A oncoproteína E7 atua, principalmente, ligando-se a proteína do retinoblastoma (pRB), responsável pelo controle do ciclo celular em pontos como G1/S e G2/M. Uma vez que E7 se liga a pRB, esta é impedida de se ligar ao fator de transcrição E2F (fator 2 de alongação). O E2F auxilia na expressão de genes relacionados à continuidade do ciclo celular e, assim, estimula a proliferação celular (Park et al., 2000; Giarre et al., 2001).

Embora em torno de 90% das mulheres apresentarem uma infecção transitória pelo HPV e a maioria das infecções por este vírus ser rapidamente eliminada devido à rápida resposta imunológica do hospedeiro, a infecção por HPV é determinante para o desenvolvimento do CCU (Stanley et al., 2010). Quando o HPV não é eliminado, seu genoma viral permanece em sua forma episomal no núcleo da célula epitelial até que aconteça sua integração ao genoma do hospedeiro. Durante a integração, foi demonstrada que a região do gene E2, responsável pela regulação de E6 e E7 (genes promotores de tumor), é fragmentada e não integrada ao genoma do hospedeiro, permitindo que E6 e E7 sejam superexpressas, levando ao desenvolvimento de LSIL, HSIL e de carcinoma invasivo como consequência (Jeon et al., 1995; Zur Hausen et al., 2002).

Figura 3. Progressão Patológica da infecção por HPV. (A) Representação esquemática do genoma de um HPV de subtipo de alto risco. Pode-se observar dois promotores, representados com a letra “P”, as regiões genéticas de expressão precoce e tardia, regiões regulatórias *upstream* (representada pela sigla em inglês URR), assim como os sítios de poliadenilação. (B) Ilustração da patogênese do câncer de colo do útero causado por HPV, onde observa-se a transformação do epitélio normal após infecção podendo migrar para lesão escamosa intraepitelial de baixo grau (LSIL) ou lesão escamosa intraepitelial de alto grau (HSIL) até sua evolução para câncer invasivo. Ilustrações adaptadas de Fehrmann et al. (2003) e Woodman et al. (2007).

SERINO-PROTEASES E CARCINOGENESE

São classificadas como proteases as enzimas capazes de realizar proteólise, ou seja, aquelas cujo papel é desfazer ligações entre peptídeos. Estas enzimas são fisiologicamente importantes e amplamente distribuídas dentro de um organismo (López-Otín et al., 2008). No entanto, sabe-se que no contexto do câncer algumas proteases podem estar associadas ao crescimento tumoral, angiogênese e a progressão do câncer (Yang et al., 2009).

As proteases podem ser classificadas de acordo com o grupo reativo envolvido no seu sítio ativo. As serino-proteases são caracterizadas por apresentarem uma tríade catalítica composta por serina, aspartato e histidina (Di Cera, 2009). Portanto, são uma vasta categoria de proteases que utilizam a serina como aminoácido nucleofílico no sítio ativo (Di Cera, 2009). Este grupo pode ainda ser dividido em proteases do tipo tripsina, quimiotripsina e do tipo elastase.

Aproximadamente 30% das proteases são classificadas como serino-proteases (Hedstrom, 2002). As serino-proteases podem ser encontradas ancoradas a membrana plasmática em diferentes maneiras, sendo então classificadas como serino-proteases transmembrana do tipo I, que possuem o domínio transmembrana de passagem única próximo à região C-terminal; serino-proteases transmembrana do tipo II, que possuem um sinal de ancoragem próximo ao N-terminal e por conta disto possuem uma longa região C-terminal extracelular, onde se encontra o domínio serino-protease; e por fim a serino-protease ancorada por glicosilfosfatidilinositol (GPI), que como o nome diz, ancora a serino-protease próximo à sua região C-terminal, mantendo a protease para o lado de fora da membrana (Szabo et al., 2011).

Dentre estas proteases, matriptase é uma serino-protease transmembrana do tipo II de grande importância, devido ao fato de ter-se revelado sua desregulação em vários tipos de câncer de células epiteliais (Cheng et al., 2014; Oberst et al., 2002; Vogel et al., 2006; Kanemaru et al., 2017; Sales et al., 2015). A Matriptase, também conhecida como ST14 (do inglês, *Suppression of Tumorigenicity-14*), descrita inicialmente na década de 90 a partir de um estudo com células humanas de câncer de mama, é uma protease com atividade de degradação de gelatina em matriz (Shi et al., 1993). Ela é uma glicoproteína de aproximadamente 80-90 KDa, inicialmente sintetizada em sua forma inativa, como um zimógeno, e que possui estruturalmente um curto domínio citoplasmático próximo à região N-terminal, uma região transmembrana e possui seu domínio catalítico localizado extracelularmente (domínio serino protease). Ainda, possui vários domínios não catalíticos, como um domínio SEA (do inglês, *sea urchin sperm protein/enterokinase/agrin*), dois domínios CUB (do inglês, *C1r/C1s, urchin embryonic growth factor and bone morphogenetic protein-1*) e 4 domínios LDLA (do inglês, *low-density lipoprotein receptor class A*); todos localizados extracelularmente (Uhland, 2006; Szabo et al., 2011).

A expressão de matriptase é encontrada elevada dentro do contexto de diferentes carcinomas (List et al., 2006; Cheng et al. 2006). A matriptase atua clivando a proforma do Fator de Crescimento de Hepatócito (pró-HGF) em Fator de Crescimento de Hepatócito (HGF), culminando com a ativação da via PI3K-Akt-mTor que, por sua vez, permite a proliferação descontrolada e diminuição do apoptose celular (Szabo et al., 2011). A matriptase pode ainda ativar o Receptor Ativado por

Proteases-2 (PAR-2), que culmina com a ativação do fator de transcrição NFkB, responsável pela expressão de citocinas pró-inflamatórias (Sales et al., 2015). Alguns autores demonstraram ainda, por experimentos *in vitro*, que matriptase é capaz de clivar e converter pró-uPA (pró-ativador de plasminogênio tipo uroquinase) em sua forma ativa, assim evidenciando sua influência na degradação de matriz extracelular e migração celular (Lee et al., 2000; Takeuchi et al., 2000). Por fim, Sales e seus colaboradores (2010) demonstraram que matriptase está envolvida com a ativação de pró-caliceína 5 e 7, ambas proteases pró-inflamatórias, ativando assim sua cascata e contribuindo para a evolução da Síndrome de Netherton.

A ação da matriptase pode ser diretamente inibida pelo Inibidor de Ativador do Fator de Crescimento de Hepatócito (HAI) do tipo 1 ou 2 (HAI-1 ou HAI-2, respectivamente), ambos inibidores de serino-proteases (Oberst et al., 2005; Szabo et al., 2008; Nonboe et al., 2017). HAI-1 é um inibidor de serino-protease do tipo Kunitz codificado pelo gene *SPINT1*. É uma proteína transmembrana do tipo I que foi inicialmente descoberta como uma serino-protease produzida no fígado e liberada na corrente sanguínea como um zimógeno. Estruturalmente, este inibidor transmembrana é composto de dois domínios Kunitz e um domínio LDLA, assim como um motivo próximo à região N-terminal que contém um domínio com oito cisteínas (também chamado de MANEC) (Shimomura et al., 1997; Hong et al., 2015). HAI-2, por sua vez, é outro inibidor de serino-protease não muito diferente de HAI-1. É uma molécula menor apresentando apenas dois domínios Kunitz seguidos de um domínio transmembrana C-terminal (Kawaguchi et al., 1997; Shimomura et al., 1997). HAI-2, assim como HAI-1, tem sido demonstrado fisiologicamente como potente inibidor da atividade de matriptase, mesmo embora autores reconheçam certa complexidade em dissecar suas funções devido ao fato da ausência de seu gene ter se demonstrado letal em camundongos (Mitchell et al., 2001; Szabo et al., 2008). Os níveis de expressão de HAI-1 e -2, ainda, mostraram funcionar como fatores de prognóstico do carcinoma de colo do útero (Nakamura et al., 2009a; 2009b). Assim como em outro estudo do mesmo grupo, foi evidenciado uma desregulação de ambos os inibidores dentro do contexto de câncer endometrial, novamente correlacionando a baixa expressão destas proteínas com um mal prognóstico da patologia (Nakamura et al., 2011). HAI-2 ainda tem sido constantemente relacionada dentro do contexto de câncer de próstata, onde estudos

têm demonstrado que a expressão de HAI-2 tem diminuído enquanto matriptase aumenta neste câncer além do fato de HAI-2, quando superexpressa, atuar contra a motilidade celular no câncer de próstata (Tsai et al., 2014; Wu et al., 2017).

Outras duas importantes proteases são as calicreínas 5 e 7 (respectivamente abreviadas em inglês como KLK5 e KLK7). Estas fazem parte de uma família de 15 serino-proteases classificadas como peptidases relacionadas a calicreínas que contém domínios catalíticos do tipo tripsina ou quimotripsina (Clements et al., 2001). Elas estão fisiologicamente relacionadas ao processo de descamação epitelial da pele, por exemplo, uma vez que se encontram altamente expressas em queratinócitos diferenciados no estrato córneo, onde contribuem para este processo clivando os corneodesmossomas (Brattsand et al., 2005; Egelrud et al., 2005). Dentro de um contexto patológico, ambas proteases se encontram superexpressas em linhagens tumorais e células de cultura primária de carcinoma de células escamosas do colo do útero (Santin et al., 2004; Shaw et al., 2008; Tian et al., 2004). Além deste grupo, mais recentemente outros grupos como o de Lei (2019) têm relacionado um grupo de calicreínas, dentre elas a 5 e a 7, como responsáveis por regular sinergicamente os processos de migração e invasão dentro do contexto de câncer endometrial. Assim como observado anteriormente, estas proteases também apresentam seus inibidores fisiológicos, como é o caso do *Lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor* (LEKTI), que acaba inibindo a via proteolítica da matriptase indiretamente através da inibição da KLK5 e KLK7 (Egelrud et al., 2005). LEKTI é uma proteína composta por dois domínios tipo Kazal clássicos, dentre os quinze que compõe sua estrutura, e formado por 1064 aminoácidos (Meyer-Hoffert U, 2009). LEKTI atua dentro do processo de descamação através da inibição de calicreínas, como KLK5 e KLK7, processo controlado por pH. Conforme o pH se torna mais ácido nas camadas superiores do epitélio escamoso, LEKTI desacopla das calicreínas, assim permitindo que estas atuem favoravelmente ao processo de descamação (Deraison et al., 2007). Devido à sua atuação conjunta com calicreínas relacionadas ao câncer, estudos têm demonstrado que a re-expressão de LEKTI em células de câncer de cabeça e pescoço levou a uma diminuição na migração e invasão de linhagens imortalizadas para esta doença (Jayakumar et al., 2014).

Portanto, o estudo do perfil e comportamento proteolítico, em lesões HSIL (Figura 4), se mostra de grande importância devido a comprovada influência destas

vias no contexto de diversos cânceres. Ainda, ampliar o conhecimento deste perfil em amostras humanas de HSIL em colo de útero, ou seja, estágios anteriores ao de câncer propriamente dito, se faz necessário na contribuição do entendimento destas proteases, no carcinoma de colo do útero, em pacientes infectadas com HPV. Finalmente, por possuírem domínios catalíticos localizados extracelularmente, estas enzimas podem funcionar como alvos terapêuticos interessantes para futuras terapias a serem desenvolvidas para esta patologia.

Figura 4. Via Proteolítica da Matriptase, Caliceínas 5 e 7 e seus Inibidores. A matriptase é uma protease capaz de ativar pró-HGF, PAR-2 e pró-KLK5 e 7 em suas formas ativas, assim contribuindo para a ativação da via de Akt e NFkB, ambas vias que promovem crescimento e proliferação celular, assim levando como consequência quando desreguladas, à formação de câncer. Além destas, as KLKs possuem um papel importante tanto na descamação epitelial quanto indiretamente no desenvolvimento do câncer. Como demonstrado neste esquema, estas proteases possuem inibidores, como HAI-1 e HAI-2 para matriptase e LEKTI para KLK5 e 7.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar se há modulação do perfil proteolítico, em pacientes infectadas por HPV, portadoras de lesão intraepitelial de alto grau (HSIL).

Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão de Matriptase, HAI-1, HAI-2, Calicreína-5, Calicreína-7 e LEKTI em biópsias: (i) de tecido com características normais, e (ii) de lesão de alto grau; oriundas de pacientes infectadas por HPV:

- Otimizar os anticorpos responsáveis para cada proteína-alvo;
- Padronizar técnica de imuno-histoquímica para o tipo de tecido utilizado e para as proteínas-alvo;

- Avaliar qualitativamente se há mudança no padrão de expressão das serino-proteases e inibidores em amostras: (i) de tecido com características normais, e (ii) de lesão HSIL;

- Estabelecer método de quantificação de expressão proteica no epitélio a partir das marcações oriundas da imuno-histoquímica.

- Comparar as alterações na expressão das serino-proteases com as alterações na expressão dos respectivos inibidores, e delinear possível correlação.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Aspectos éticos

Esta pesquisa foi submetida à avaliação pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia-FMRP/USP e após sua aprovação, foi avaliada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), onde recebeu parecer favorável à execução do estudo registrado sob o número 3.130.450 (ANEXO I).

O estudo foi desenvolvido no Ambulatório de Moléstias Infectocontagiosas em Ginecologia (AMIG) do HC-FMRP-USP e no Laboratório de Proteases e Biologia do Câncer no departamento de Biologia Celular e Molecular da FMRP-USP. O Ambulatório é referência no atendimento de mulheres que apresentaram rastreamento positivo para lesões pré-neoplásicas do colo uterino, assim como mulheres portadoras do HIV, para os 26 municípios da Direção Regional de Saúde XIII.

2. Participantes da Pesquisa

Todas as participantes incluídas neste estudo foram informadas sobre o objetivo da pesquisa por meio de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O material biológico foi armazenado mediante a assinatura do mesmo (ANEXO II). Esta pesquisa não interferiu na conduta clínica das participantes da pesquisa e as mesmas foram selecionadas pelos seguintes critérios de inclusão:

- Idade entre 18 e 55 anos;
- Genitoscopia com lesão de alto grau em colo, vagina e ou vulva;
- Exame anatomopatológico da biópsia cervical, vaginal e ou vulvar confirmando Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (*High Grade Squamous Intraepithelial Lesion*, HSIL).

Os critérios de exclusão foram:

- Participantes gestantes;

- Exame anatomopatológico da biópsia cervical, vaginal e ou vulvar confirmando Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (*Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion*, LSIL).

Duas biópsias foram coletadas de cada uma das participantes do estudo: biópsia de tecido com características normais (“normal”) e biópsia de tecido lesionado (“lesão”).

É importante destacar o fato de que amostras das 15 participantes deste estudo foram conferidas, no que diz respeito à PCR para a presença do DNA viral do HPV. No momento da coleta, os clínicos coletavam uma biópsia para esta análise, como rotina. Das participantes deste estudo, apenas 2 apresentaram resultado negativo para esta PCR, mesmo apresentando exame colposcópico de lesão intraepitelial de alto grau. Há evidências, na literatura, de que a PCR, nestes casos, pode apresentar resultado falso-negativo (Ferreccio et al., 2003; Dinc et al., 2010). Portanto, mantivemos estas duas participantes no estudo.

3. Obtenção de biópsias de colo do útero de pacientes

As mulheres encaminhadas ao AMIG para investigação de lesões pré-neoplásicas do colo uterino seguem o protocolo de condutas do serviço que inclui a realização do exame de genitoscopia. Este é realizado com a utilização do colposcópio e segue etapas padronizadas. As pacientes que cumpriam o critério de inclusão para o presente estudo foram convidadas a participar da pesquisa através da assinatura do TCLE. Então, duas biópsias dirigidas foram coletadas de cada paciente com a pinça de Medina modificada de 4 mm e colocadas em formalina tamponada a 4%: (i) a primeira foi obtida da área de maior alteração colposcópica (“Lesão”); e (ii) a segunda foi obtida de uma região morfolologicamente normal do colo uterino (“Normal”). Ambos os fragmentos de biópsia foram encaminhados ao laboratório de Proteases e Biologia do Câncer do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP-USP para posterior processamento.

4. Processamento das biópsias e avaliação do grau da lesão

As biópsias colhidas foram mantidas refrigeradas entre 6 – 10 °C *overnight*. Então, procedeu-se ao processamento das mesmas que consistiu em: (i) desidratação, através da passagem por uma bateria de álcoois com crescentes concentrações (50%, 70%, 80%, 90%, 95% e absoluto), sendo 40 minutos de incubação para cada concentração; (ii) diafanização, através de 2 incubações com solvente orgânico (xilol), sendo 30 minutos cada; e (iii) inclusão em parafina, sendo duas incubações em parafina líquida, de 1 hora e 30 minutos cada, seguida da solidificação da amostra tecidual em bloco de parafina, com o auxílio do equipamento *Paraffin Embedding Station (Histoembedder) EG1160* (LEICA, Wetzlar – Alemanha).

Após a inclusão, foram realizados cortes de aproximadamente 10 µm de espessura, seguidos da desparafinização e coloração com hematoxilina e eosina (H&E), para a avaliação histopatológica das mesmas com a finalidade de confirmar a presença de lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL). Para tal avaliação, critérios bem estabelecidos de graduação histopatológica desta lesão foram analisados: estratificação das camadas epiteliais, diferenciação celular, pleomorfismo e hiper cromasia nucleares, proporção núcleo-citoplasma e presença de mitoses atípicas (Darragh et al., 2012). Nas amostras HSIL, estas anormalidades foram observadas em pelo menos dois terços do epitélio, podendo compreender praticamente a totalidade da área epitelial. As biópsias da região normal e patológica do colo do útero foram gentilmente avaliadas pelo Prof. Dr. Alfredo Ribeiro Silva, do Departamento de Patologia da FMRP-USP. Esta avaliação foi realizada de maneira cega, ou seja, o avaliador não tinha informações a respeito das lâminas avaliadas. Esta etapa pode ser observada na Figura 5.

Figura 5. Processamento das biópsias e avaliação do grau da lesão. Logo após colhidas, as biópsias eram armazenadas em formalina tamponada por 18h. Então, as mesmas eram processadas e incluídas em parafina, coradas com H&E e avaliadas sobre seu grau de lesão. As biópsias eram classificadas como “normal” (com características histopatológicas normais) ou “lesão” (com presença de atipias em, pelo menos, dois terços do epitélio).

5. Imuno-histoquímica

Inicialmente, foram realizados cortes entre 6-10 µm de espessura das biópsias de colo do útero já incluídas em parafina e adequadamente classificadas histopatologicamente. Estes cortes foram depositados em lâminas gelatinizadas, para conferir firmeza e adesão entre os fragmentos de biópsia e a lâmina, assim evitando que o tecido se desprendesse durante o protocolo de imuno-histoquímica. Para cada lâmina, foi adicionado um corte da biópsia normal e logo abaixo outro corte da biópsia de lesão da mesma paciente. Desta forma, os tecidos puderam ser submetidos às mesmas condições durante todo o experimento.

Neste estudo, foram realizadas imuno-histoquímicas para investigação das seguintes proteínas: Matriptase (anticorpo anti-matriptase humana, R&D, n° AF3946, concentração de 0,5µg/mL), Calicreína 5 (KLK5) (anticorpo anti-calicreína-5 humana, Abcam, n° ab28565, concentração de 2,0µg/mL), Calicreína 7 (KLK7) (anticorpo anti-calicreína-7 humana, R&D, n° AF2624, concentração de 0,125µg/mL), LEKTI (anticorpo anti-Lekti humano, Sigma, n° A96960, concentração de 2,0µg/mL), HAI-1 (anticorpo anti-HAI-1 humano, R&D, n° HID01, concentração de 0,166µg/mL) e HAI-2 (anticorpo anti-HAI-2 humano, R&D, n° IWO01, concentração de 1,0µg/mL).

Para realização do protocolo de imuno-histoquímica, as amostras foram inicialmente desparafinizadas através de 2 incubações em xilol por 10 minutos e reidratadas em concentrações decrescentes de álcool (absoluto, 95%, 90%, 80%, 70%, 50%) até chegar na água destilada, em incubações de aproximadamente 1 minuto cada. Então, para que ocorresse exposição e recuperação da estrutura dos epítomos das proteínas, foi realizada a recuperação antigênica em forno micro-ondas comum. Tal recuperação consistiu em aquecimento das amostras por 16 minutos a potência de 10%, seguido de resfriamento por 20 minutos. Para cada proteína investigada, foram utilizados diferentes tampões:

- **Tampão Citrato de Sódio (0,01M; pH:6,0):** Utilizado para KLK7, HAI-1, HAI-2 e LEKTI;
- **Tampão Ácido Cítrico com Tween 20 (0,01M; pH:6,0):** Utilizado para KLK5;
- **Tampão EDTA com Tween 20 (0,01M; pH:8,0):** Utilizado para Matriptase.

Após a recuperação antigênica, os tecidos foram lavados 3 vezes com PBS (tampão fosfato-salino) por 5 minutos cada, e seguiram para a etapa de bloqueio da peroxidase endógena, que consiste em um pré-tratamento do tecido de forma a evitar a marcação inespecífica (*background*) resultante da reação entre anticorpos conjugados com HRP (*horseradish peroxidase*) e a peroxidase endógena. Para tanto, foram realizadas duas incubações com H₂O₂ diluído em metanol em uma concentração final de 3%. Cada incubação foi de 15 minutos e os tecidos foram lavados com PBS por 5 minutos após a última incubação.

Após o bloqueio da peroxidase endógena, as amostras foram incubadas com 2% de BSA diluído em PBS por 30 minutos, para então ser adicionado o anticorpo primário. Foram utilizados anticorpos específicos para cada proteína a ser estudada (descritos anteriormente), com concentrações otimizadas para cada anticorpo (previamente descritas). As concentrações ideais foram encontradas através de experimentos de otimização dos anticorpos utilizados (descrição detalhada na Seção dos Resultados). Ainda, todos os anticorpos foram diluídos em PBS contendo 1% de BSA. Como controles positivos, foram utilizadas biópsias de pele humana para todos os anticorpos, com exceção do anticorpo anti-matriptase, em que foi utilizada biópsia de pele de camundongo transgênico K5-Matriptase (amostra biológica oriunda de protocolo previamente aprovado pela CEUA-FMRP-USP sob o número 003/2015-1), devido ao fato deste camundongo superexpressar matriptase na camada basal da epiderme e folículo piloso, e deste tecido ter sido previamente validado como controle positivo para o anticorpo anti-matriptase utilizado nesta dissertação (List et al., 2005; Friis et al., 2017). Como controles negativos, ao lugar do anticorpo primário, foi utilizada IgG produzida nos mesmos animais em que o anticorpo primário fora produzido, sendo assim, foi utilizada IgG produzida em coelho (KLK5 e LEKTI), cabra (HAI-1 e HAI-2) e camundongo (KLK7). Para a reação contra matriptase, foi utilizado PBS contendo 1% de BSA no controle negativo. A incubação com os anticorpos primários aconteceu *overnight*. Então, as lâminas foram lavadas seis vezes com PBS, para a seguir, serem incubadas com os anticorpos secundários por 30 minutos. Foram utilizados os seguintes anticorpos secundários: *Biotinylated anti-rabbit IgG (H+L) BA-1000* (Vector laboratories, California – EUA) para KLK5 e LEKTI; *Biotinylated anti-goat IgG (H+L) BA-9500* (Vector laboratories, California – EUA) para HAI-1 e HAI-2; *Biotinylated anti-mouse IgG (H+L) BA-9200* (Vector

laboratories, California – EUA) para KLK7; e *Biotinylated anti-sheep IgG (H+L) BA-6000* (Vector laboratories, California – EUA) para Matriptase. Todos os anticorpos secundários foram aplicados sob uma diluição de 1:500 em PBS com 1% de BSA, conforme prévia otimização. Após a lavagem com PBS, por 6x, e incubação com *VECTASTAIN Elite ABC Reagent* (Vector laboratories, Califórnia – EUA), por 30 minutos, as lâminas foram lavadas e incubadas com a solução reveladora *3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)* (Sigma-Aldrich, Missouri – EUA), seguindo instruções do fabricante, por tempos como seguem:

- **Matriptase:** 2 minutos;
- **KLK5:** 3 minutos;
- **KLK7:** 1 minuto e 30 segundos;
- **HAI-1:** 2 minutos;
- **HAI-2:** 1 minuto e 40 segundos;
- **LEKTI:** 2 minutos e 15 segundos.

Estas lâminas foram posteriormente lavadas com PBS e coradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto e 30 segundos para visualização das células e suas estruturas. Por fim, as lâminas foram desidratadas em bateria com crescentes concentrações de álcool (50%, 70%, 80%, 90%, 95% e absoluto), sendo 1 minuto de incubação em cada concentração), incubadas duas vezes com xilol, por 10 minutos cada, e montadas com meio sintético *Fluoromount G* (2:1) (EMS, EUA).

A partir daí as imagens destas biópsias foram adquiridas através do escaneamento com o microscópio BX-61 atrelado ao sistema VS120 da Olympus (Olympus Corporation, Tóquio, Japão), utilizando uma objetiva de 40x para capturar maiores detalhes celulares.

Foi utilizado *Fiji ImageJ* para quantificação e análise das imagens geradas a partir do escaneamento (Schindelin et al., 2012). Para tanto, a quantificação foi realizada de duas principais maneiras: (i) quando as proteases ou inibidores analisados eram de expressão extracelular (KLK5, KLK7 e LEKTI), quantificou-se a porcentagem da área epitelial marcada, através da divisão entre área epitelial marcada e área epitelial total, e este resultado multiplicado por 100; (ii) quando as

proteases ou inibidores eram de expressão transmembrana (Matriptase, HAI-1 e HAI-2), houveram dois tipos de quantificação, a primeira quantificou a porcentagem da área marcada predominantemente na membrana, através da divisão entre área marcada predominantemente na membrana pela área epitelial total, e este resultado multiplicado por 100; a segunda quantificou a porcentagem de área marcada de expressão difusa, quando foi observada uma diminuição na marcação da membrana. Esta quantificação foi obtida pela divisão entre a área marcada de maneira difusa nas células pela área epitelial total, com subsequente multiplicação por 100. Foi quantificada área epitelial total para cada biópsia avaliada. Estas metodologias podem ser observadas no seguinte fluxograma abordado na Figura 6.

Figura 6. Fluxograma ilustrativo dos métodos de quantificações. Para proteínas de expressão extracelular (KLK5, KLK7 e LEKTI), foi quantificada a porcentagem da área marcada (Ilustrado de rosa). Para proteínas de expressão transmembrana (Matriptase, HAI-1 e HAI-2), duas quantificações foram realizadas, uma medindo a porcentagem da área marcada especificamente na membrana e outra medindo a porcentagem de área marcada de expressão difusa na célula, para as regiões onde a expressão na membrana era muito fraca (Ilustrado de verde).

6. Análise Estatística

Os dados foram coletados em uma planilha eletrônica no Microsoft Excel® (Microsoft Corp, Redmond, WA, EUA). Inicialmente, buscou-se avaliar se os dados gerados apresentavam-se distribuídos de forma paramétrica ou não paramétrica. Para tanto, foi utilizado o programa *GraphPad Prism versão 5.0* (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) para avaliação da distribuição destes dados e, através dos testes de normalidade D'Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk, foi verificado se os dados se enquadravam ou não em um padrão de distribuição normal. Após estes testes, foi realizada análise estatística de colunas comparando os valores obtidos das quantificações das biópsias normal e lesão (HSIL) para cada proteína. Estas análises foram realizadas de maneira pareada, uma vez que uma mesma paciente apresentava uma biópsia normal e outra lesão. Os parâmetros foram comparados entre os grupos através do T teste pareado quando as amostras eram normalmente distribuídas. Caso algum grupo não apresentasse distribuição normal, era realizado o teste de Wilcoxon para comparação entre duas colunas. Os resultados foram expressos em média juntamente com desvio padrão (SD). Ainda, para avaliação de correlação entre as expressões da protease e seu respectivo inibidor no contexto patológico, foi realizado o teste de correlação do coeficiente de Pearson. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças em que a probabilidade (p) foi menor que 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Otimização das reações de imuno-histoquímica em tecido epitelial

Foi realizada a técnica de imuno-histoquímica com o objetivo de avaliar o nível de expressão proteica de serino-proteases e inibidores através da análise da expressão dos mesmos no epitélio ectocervical. Para conferir segurança e maior qualidade aos resultados oriundos desta técnica em questão, realizaram-se as seguintes etapas de otimização: (i) recuperação antigênica adequada; (ii) estabelecimento de concentração ideal para cada anticorpo contra as proteínas de interesse (Matriptase, KLK5, KLK7, LEKTI, HAI-1 e HAI-2); e (iii) tempo de exposição para a revelação com DAB (vide tabela em Figura 7A). Como ilustrado na Figura 7, utilizaram-se controles positivos previamente citados na literatura: (i) tecido epitelial oriundo de pele humana para os anticorpos anti-KLK5, anti-KLK7, anti-LEKTI, anti-HAI-1 e anti-HAI-2 (Bitoun et al., 2003; Wu et al., 2011; Lee et al., 2018; *The Human Protein Atlas*, 2019) e (ii) tecido epitelial oriundo de pele de camundongo transgênico (K5-Mat), onde a matriptase está expressa sob o controle do promotor da queratina 5 (List et al., 2005).

As Figuras 7B – 7G confirmam os locais de expressão das proteínas em seus respectivos tecidos utilizados como controles positivos. Como ilustrado, é possível observar que KLK5, KLK7 e LEKTI estão expressas nas camadas granulosa e córnea, nos tecidos utilizados como controle positivo (CP) (Figuras 7B, 7C e 7D; painéis à esquerda; setas pretas). O controle negativo (CN) para este grupo de serino-proteases e inibidor demonstrou-se isento de marcação específica (Figuras 7B, 7C e 7D; painéis à direita). Foi evidenciada forte marcação para matriptase, na região basal do epitélio, como esperado, devido ao fato de se tratar de um epitélio oriundo de camundongo K5-Mat, cuja a expressão da matriptase acompanha a expressão de queratina 5 nesta região (Figura 7E; painel à esquerda; seta preta). Além desta marcação, é possível visualizar uma marcação menos evidente, próxima à região da camada granulosa (Figura 7E; painel à esquerda; seta vermelha), que é explicada devido à ligação do anticorpo à matriptase produzida endogenamente. Em referência à expressão de HAI-1 e HAI-2, nota-se a presença de marcação, para ambas proteínas, nas regiões granulosa e córnea do epitélio utilizado como controle positivo (CP) (Figura 7F e 7G, painéis à esquerda; setas pretas). Os controles

negativos (CN) não mostraram presença de marcação inespecífica (Figura 7E, 7F e 7G; painéis à direita).

Figura 7. Validação dos anticorpos para KLK5, KLK7, LEKTI, Matriptase, HAI-1 e HAI-2 em epitélio de pele. (A) Tabela apresentando resultados da concentração ideal, em ug/mL, de cada anticorpo contra as serino-proteases e inibidores abordados neste estudo. O tempo otimizado de revelação por DAB está exibido em minutos (') e segundos ("). (B) Figura representativa da localização da marcação de KLK5 (painel à esquerda; seta preta) em pele humana. (C) Figura representativa da localização da marcação de KLK7 (painel à esquerda; seta preta) em pele humana. (D) Figura representativa da localização da marcação de LEKTI (painel à esquerda; seta preta) em pele humana. (E) Figura representativa da localização da marcação de matriptase (painel à esquerda; seta preta) em pele de camundongo K5-Mat recém-nascido. É possível visualizar marcação de matriptase endógena (painel à esquerda; seta vermelha). (F) Figura representativa da localização da marcação de HAI-1 (painel à esquerda; seta preta) em pele humana. (G) Figura representativa da localização da marcação de KLK7 (painel à esquerda; seta preta) em pele humana. A marcação específica é dada por coloração marrom. CP: Controle positivo; CN: Controle negativo. Escalas medindo 20 um como referência.

2. Alteração na expressão de Matriptase, HAI-1 e HAI-2 em biópsias de colo de útero com lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL)

Após as otimizações detalhadas no item anterior, e a fim de investigar uma possível modulação na localização da expressão das serino-proteases e inibidores aqui em estudo, foi realizada a técnica de imuno-histoquímica em biópsias com características histológicas normais e características histológicas de HSIL, em 15 pacientes.

As marcações resultantes da imuno-histoquímica foram quantificadas através do *Fiji ImageJ* (Schindelin et al., 2012). Assim, para as serino-proteases e inibidores, foi realizada quantificação da área marcada em relação à área total do epitélio uterino. No entanto, para as proteínas de expressão na membrana (matriptase, HAI-1 e HAI-2), foram realizadas, ainda, quantificações específicas para: (i) expressão predominantemente em membrana plasmática; e (ii) expressão menos predominante na membrana plasmática e, portanto, mais difusa no tecido.

Com relação às quantificações, foi possível observar um aumento significativo na porcentagem de área epitelial marcada para matriptase nas biópsias com características de HSIL, quando comparadas às biópsias histologicamente normais, da mesma paciente (comparar Figura 8A com 8B, $p=0,0004$, teste T pareado). Entretanto, a marcação predominantemente na membrana plasmática foi maior no tecido com características normais quando comparado ao tecido com características de HSIL (comparar Figura 8A com 8B, setas pretas; e Figura 8C, comparar colunas azuis e vermelhas, $p=0,0007$, teste T pareado). A marcação difusa, por outro lado, foi maior no tecido com características de HSIL quando comparado ao tecido com características normais (comparar Figura 8A e 8B, setas vermelhas; e Figura 8C, comparar colunas azuis e vermelhas, $p<0,0001$, teste T pareado). Na Figura 8C, as colunas estão representadas com desvio padrão (SD) para as quantificações “Total” (Normal, SD = 12,0%; HSIL, SD = 15,86%), “Membrana” (Normal, SD = 10,16%; HSIL, SD = 10,14%) e “Difusa” (Normal, SD = 2,61%; HSIL, SD = 17,37%).

HAI-1, um dos inibidores de matriptase, apesar de não evidenciar alteração significativa na marcação total (comparar Figura 8D com 8E), demonstrou diminuição significativa na marcação predominantemente na membrana (comparar Figura 8D com 8E, setas pretas; e Figura 8F, comparar colunas azuis e vermelhas, $p=0,0340$,

teste T pareado) enquanto sua marcação difusa aumentou (comparar Figura 8D com 8E, setas vermelhas; e Figura 8F, comparar colunas azuis e vermelhas, $p=0,0004$, teste T pareado) quando comparamos a biópsia alterada em relação àquela histologicamente normal. Na Figura 8F, as colunas estão representadas com desvio padrão para as quantificações “Total” (Normal, SD = 25,45%; HSIL, SD = 25,54%), “Membrana” (Normal, SD = 24,92%; HSIL, SD = 19,26%) e “Difusa” (Normal, SD = 1,18%; HSIL, SD = 21,77%). HAI-2 apresentou um comportamento semelhante ao de HAI-1, com diminuição da expressão na membrana (comparar Figura 8G com 8H, setas pretas; e Figura 8I, comparar colunas azuis e vermelhas, $p=0,0001$, teste T pareado) e um aumento considerável na marcação do tipo difusa deste inibidor (comparar Figura 8G com 8H, setas vermelhas; e Figura 8I, comparar colunas azuis e vermelhas, $p<0,0001$, teste de Wilcoxon) nos tecidos histologicamente característicos de HSIL. No entanto, diferentemente de HAI-1, quando se observa a marcação total é possível perceber um aumento significativo nas amostras histologicamente características de HSIL (comparar Figura 8G com 8H, $p=0,0019$, teste T pareado). Na Figura 8I, as colunas estão representadas com desvio padrão para as quantificações “Total” (Normal, SD = 18,95%; HSIL, SD = 21,67%), “Membrana” (Normal, SD = 19,69%; HSIL, SD = 13,43%) e “Difusa” (Normal, SD = 1,45%; HSIL, SD = 13,80%).

Figura 8. Alteração na expressão de Matriptase, HAI-1 e HAI-2 em biópsias de colo de útero com lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL). (A) Imagem representativa de biópsia do colo uterino histologicamente normal (normal) marcada para matriptase. (B) Imagem representativa de biópsia do colo uterino com características histológicas de HSIL (HSIL) marcada para matriptase. (C) Gráfico representando as quantificações, em % de área epitelial marcada, de matriptase na membrana, difusa e total. (D) Imagem representativa de biópsia normal marcada para HAI-1. (E) Imagem representativa de biópsia HSIL marcada para HAI-1. (F) Gráfico representando as quantificações, em % de área epitelial marcada, de HAI-1 na membrana, difusa e total. (G) Imagem representativa de biópsia normal marcada para HAI-2. (H) Imagem representativa de biópsia HSIL marcada para HAI-2. (I) Gráfico representando as quantificações, em % de área epitelial marcada, de HAI-2 na membrana, difusa e total. (J e K) Imagens de biópsia normal e HSIL coradas com H/E. As setas pretas apontam para marcações predominantemente na membrana plasmática. Setas vermelhas apontam para marcações difusas. As barras azuis dos gráficos representam as biópsias normais enquanto as barras vermelhas representam as biópsias HSIL. Escalas medindo 20 um como referência.

3. Alteração na expressão de KLK5 e KLK7 em biópsias de colo de útero com lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL)

Outro grupo de serino-protease que apresentou alterações na imuno-histoquímica foi o das calicreínas, aqui representadas por KLK5 e KLK7. A expressão proteica do inibidor de calicreínas, LEKTI, também sofreu alterações, apesar de não significativas. Como é possível observar na Figura 9, estas proteínas apresentaram marcações homogêneas, sendo quantificadas apenas a área marcada dentro do epitélio, uma vez que são proteínas secretadas pelas células e não proteínas de membrana como as supracitadas. Foi possível observar um aumento significativo na área epitelial marcada para KLK5 e KLK7 nas amostras com características histológicas de HSIL quando comparadas às amostras histologicamente normais (para KLK5: comparar Figuras 9A com 9B, setas pretas, e Figura 9C, comparar barras azul e vermelha, $p=0,0146$, teste T pareado; para KLK7: comparar Figuras 9D com 9E, setas pretas, e Figura 9F, comparar barras azul e vermelha e $p=0,0106$, teste T pareado). Nas Figuras 9C e 9F, as colunas estão representadas com desvio padrão para a quantificação “Total” (para KLK5: Normal, SD = 19,72%; HSIL, SD = 25,05%; para KLK7: Normal, SD = 9,27%; HSIL, SD = 18,08%). LEKTI, inibidor fisiológico destas serino-proteases, não demonstrou alteração significativa em sua expressão, apesar de ser possível visualizar uma tendência para a diminuição da área marcada por este inibidor quando o tecido apresenta características de HSIL. Na Figura 9I, as colunas estão representadas com desvio padrão para a quantificação “Total” (Normal, SD = 21,55%; HSIL, SD = 19,17%).

Figura 9. Alteração na expressão de KLK5 e KLK7 em biópsias de colo de útero com lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL). (A) Imagem representativa de biópsia do colo uterino histologicamente normal (normal) marcada para KLK5. (B) Imagem representativa de biópsia do colo uterino com características histológicas de HSIL (HSIL) marcada para KLK5. (C) Gráfico representando as quantificações, em % de área epitelial marcada, de KLK5. (D) Imagem representativa de biópsia normal marcada para KLK7. (E) Imagem representativa de biópsia HSIL marcada para KLK7. (F) Gráfico representando as quantificações, em % de área epitelial marcada, de KLK7. (G) Imagem representativa de biópsia normal marcada para LEKTI. (H) Imagem representativa de biópsia HSIL marcada para LEKTI. (I) Gráfico representando as quantificações, em % de área epitelial marcada, de LEKTI. (J e K) Imagens representativas de biópsia normal e HSIL coradas com H/E. As setas pretas apontam para marcações específicas. As barras azuis dos gráficos representam as biópsias normais enquanto as barras vermelhas representam as biópsias HSIL. Escalas medindo 20 μ m como referência.

4. O balanço entre a expressão da serino-protease e de seu respectivo inibidor apresenta correlação fraca entre Matriptase:HAI-2 e KLK7:LEKTI em biópsias com características pré-neoplásicas

Uma vez que foi observada a alteração dos níveis proteicos de serino-proteases e seus inibidores, em lesões HSIL, prosseguiu-se à análise de correlação entre as serino-proteases e seus inibidores cognatos: Matriptase e HAI-1, Matriptase e HAI-2, KLK5 e LEKTI, KLK7 e LEKTI, como pode-se observar na Figura 10 abaixo.

Dentro do contexto de biópsias com características histológicas de HSIL, quando se observa a relação entre matriptase e seus inibidores HAI-1 e HAI-2 (Figuras 10A e 10B, respectivamente) não é possível encontrar correlação entre o aumento na expressão de matriptase e a diminuição na expressão de HAI-1 ($r = 0,0278$ e $p = 0,9215$; teste de correlação do coeficiente de Pearson), embora ter sido possível encontrar uma correlação fraca e positiva entre a expressão de matriptase e HAI-2 que, no entanto, não foi estatisticamente significativa ($r=0,3599$ e $p=0,1876$; teste de correlação do coeficiente de Pearson), em lesões HSIL. Quando esta avaliação é transportada para a correlação entre KLK5 e KLK7 em relação a LEKTI, observa-se um perfil semelhante, a qual não foi observado correlação entre as expressões de KLK5 e LEKTI ($r = 0,2418$ e $p= 0,3854$; teste de correlação do coeficiente de Pearson). Alternativamente, foi observada uma correlação fraca e positiva entre a expressão de KLK7 com a expressão de LEKTI que, no entanto, não foi estatisticamente significativa ($r=0,3951$ e $p=0,1449$; teste de correlação do coeficiente de Pearson), como observado nas Figuras 10 C e D, respectivamente.

Figura 10. O balanço entre a expressão da serino-protease e de seu respectivo inibidor apresenta correlação fraca entre Matriptase:HAI-2 e KLK7:LEKTI em biópsias com características pré-malignas. **(A)** Correlação entre a expressão de matriptase e seu inibidor HAI-1 ($r = 0,0278$); **(B)** Correlação entre a expressão de matriptase e seu inibidor HAI-2 ($r = 0,3599$); **(C)** Correlação a expressão de KLK5 e seu inibidor LEKTI ($r = 0,2418$); **(D)** Correlação entre a expressão de KLK5 e seu inibidor LEKTI ($r = 0,3951$). Nenhuma das correlações avaliadas se demonstrou forte ou estatisticamente significativa. Foi realizado teste de correlação do coeficiente de Pearson.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Primeiramente, como mencionado na seção dos materiais e métodos, é importante discutir sobre as duas participantes deste estudo que apresentaram resultado negativo para a detecção de DNA viral do HPV por PCR, realizada no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. As biópsias, apesar de negativas para o DNA viral do HPV, mostraram características de anormalidade celular em quase a totalidade de seu epitélio, assim como as de outras participantes deste estudo. Apesar de testes de PCR para HPV apresentarem alta sensibilidade (entre 85 e 90%) e especificidade (acima de 60%), autores têm relatado que a sua utilização isolada possui limitações, acarretando em resultados falso-negativos (Ferreccio et al., 2003; Goodman, 2015). Desta forma, para maior eficácia na avaliação, propõe-se o uso combinado de diferentes técnicas, como colposcopia e/ou citologia em adição aos testes de DNA para diagnóstico do HPV (Ferreccio et al., 2003; Kulmala et al., 2004; Goodman, 2015). Reforçando esta ideia, Castle e colaboradores (2008) evidenciaram, dentro de um grupo de 621 pacientes com lesões de alto grau, 33 casos com resultado negativo na PCR para HPV. Assim, não se pode excluir a possibilidade de haver resultados falso-negativos durante a confirmação da presença do DNA viral por PCR.

Em nossos resultados, evidenciou-se um aumento significativo na expressão de matriptase em tecidos pré-neoplásicos, quando comparados com biópsias de características normais oriundas das mesmas pacientes infectadas por HPV. Neste contexto, os inibidores HAI-1 e HAI-2 também se encontraram alterados. Há diversos estudos na literatura que apontam a desregulação de serino-proteases e seu consequente envolvimento no surgimento e progressão de diversos tipos de câncer. Estudos como o de Oberst e seus colaboradores (2001) demonstram que matriptase e HAI-1 possuem expressões alteradas em diversos tipos de câncer de origem epitelial (carcinomas), como o carcinoma de mama, de ovário e de cólon. Ainda segundo os mesmos autores, estas proteínas, entretanto, não estão expressas em cânceres de origem mesenquimal. Matriptase também tem sido associada ao desenvolvimento de câncer endometrial, onde foi demonstrada sua superexpressão em um estudo contendo 65 amostras neoplásicas quando comparadas a amostras normais (Nakamura et al., 2009). A expressão aberrante de matriptase nestas

amostras possui relação direta com a profundidade de invasão no miométrio e com um prognóstico ruim do câncer endometrial (Nakamura et al., 2009). Do mesmo modo, a expressão desregulada de matriptase tem sido descrita para outros tipos de câncer, como carcinoma oral de células escamosas, carcinoma de esôfago, adenocarcinoma ductal de pâncreas, câncer de pâncreas, entre outros (Chou et al., 2013; Cheng et al., 2006 e 2014; Uhland et al., 2009; Tsai et al., 2014). HAI-1 e HAI-2, inibidores de matriptase, também têm sido frequentemente relatados por estarem desregulados dentro do contexto do câncer (Parr et al., 2001; Nakamura et al., 2011; Baba et al., 2012; Fukushima et al., 2011; Yamauchi et al., 2004). Há indicações de que HAI-1 pode estar relacionado à regulação da disseminação metastática de células de adenocarcinoma pancreático através da inibição de matriptase, o que foi comprovado *in vitro* pela utilização das células S2-CP8 e *in vivo* através de xenotransplante (Ye et al., 2014). Em tumores pouco diferenciados na próstata, o aumento da proteólise causada por matriptase tem sido associado à diminuição da capacidade inibitória de HAI-2, devido à diminuição em sua expressão (Bergum et al., 2010). Pesquisas utilizando camundongos nocautes para o gene que codifica a matriptase lançam luz ao fato dela estar associada a funções de diferenciação epidermal, uma vez que estes camundongos apresentaram anormalidades histológicas e funcionais no estrato córneo da pele, assim prejudicando sua função de barreira (List et al., 2002). Além disto, outros pesquisadores têm ligado matriptase a duas vias de sinalização dependentes de sua ativação e que contribuem na transformação maligna. Primeiro, a clivagem de pró-HGF associado à membrana de queratinócitos, pela atividade proteolítica da matriptase, demonstrou ativar a via cMet-Akt-mTor, via relacionada à sobrevivência e proliferação celular (Szabo et al., 2011). Segundo, a atividade proteolítica de matriptase ao clivar PAR-2 em queratinócitos ativa a via de sinalização inflamatória Gai-NFkB (Sales et al., 2015). Em síntese, resultados como estes nos levam a refletir sobre a regulação de junções célula-célula e ativação das vias cMet-Akt-mTor e Gai-NFkB em amostras HSIL de colo de útero.

Em um estudo utilizando amostras normais, lesões pré-malignas de baixo grau, lesões pré-malignas de alto grau e amostras de câncer de colo de útero invasivo de pacientes infectadas com HPV, foi observada expressão aumentada de matriptase em lesões HSIL, mas não em amostras normais (Lee et al., 2005). Além

disso, foi observada uma alteração no padrão de expressão da matriptase, comumente expressa na membrana celular, para uma expressão citoplasmática em lesões de alto grau (Lee et al., 2005). Estes resultados corroboram àqueles descritos na Figura 8 desta dissertação, que demonstraram uma alteração significativa no padrão de expressão não só de matriptase, mas de HAI-1 e HAI-2, em amostras HSIL.

As figuras 8F e 8I nos permitem visualizar um comportamento análogo na expressão de HAI-1 e HAI-2, visto que tiveram sua expressão diminuída na membrana plasmática e aumentada de forma difusa nas células em amostras HSIL. A influência de HAI-1 no desenvolvimento de diferentes tipos de câncer já tem sido descrita através da inibição de matriptase, e por consequência, a redução na ativação de vias de desenvolvimento e progressão tumoral associadas a matriptase (Baba et al., 2012; Cheng et al., 2009; Ye et al., 2014). Além disso, a superexpressão de HAI-1 está envolvida com o aumento de expressão de E-caderina e diminuição na expressão de Vimentina e SIP1 (do inglês *Smad interacting protein 1*), assim demonstrando sua contribuição na manutenção de um epitélio com fenótipo epitelial normal (Nakamura et al., 2011; Cheng et al., 2009 e Fukushima et al., 2011). Do mesmo modo Ye e seus colaboradores, em 2014, relataram uma redução no tamanho tumoral e na formação de nódulos metastáticos em modelo de câncer adenopancreático quando HAI-1 teve sua expressão normalizada na membrana celular. Desta forma, estes resultados corroboram com os evidenciados nesta dissertação, uma vez que houve diminuição significativa de HAI-1 na membrana plasmática em biópsias HSIL. Por outro lado, HAI-2 também tem sido extensivamente associado a diferentes tipos de câncer. Em sua maioria, HAI-2 apresenta uma diminuição de sua expressão dentro do contexto patológico (Bergum et al., 2010; Nakamura et al., 2011). Há ainda pesquisas que demonstram inibição de matriptase, quando HAI-2 se desloca para a superfície celular, assim evidenciando a importância da localização celular de HAI-2 para o correto desempenho de sua função de inibição (Chang et al., 2015). Novamente, estes resultados convergem com as observações na Figura 8, visto que a migração na expressão de HAI-2 da membrana para uma expressão mais difusa pode impossibilitá-lo de inibir matriptase, uma vez que seu local de ativação é na membrana plasmática. Esta, por sua vez, também demonstrou este movimento

subcelular, embora o anticorpo utilizado identificar apenas matriptase total e não ativa. No entanto, Friis e seu grupo (2013) relataram a capacidade de ativação recíproca entre os zimogênios de prostasina e matriptase na membrana plasmática. Como as duas proteínas se encontram na membrana, este é um provável mecanismo de ativação da matriptase observada na Figura 8. Esta ativação aumentada pode levar a um rápido *turnover* de matriptase pois quando ativada, ela se complexa com HAI-1 sendo liberada da membrana para o meio extracelular (Friis et al., 2013). Isto justificaria a diminuição de matriptase na membrana encontrada em lesões HSIL nesta dissertação, uma vez que matriptase pode estar sendo demasiadamente ativada, assim se apresentando de maneira difusa. Além disso, Larsen e seus colaboradores (2013) descreveram a possibilidade de HAI-2 prevenir a liberação de matriptase em momentos de baixo *turnover*, assim promovendo acumulação de matriptase intracelular. Estes resultados vão de encontro ao acúmulo intracelular de matriptase e HAI-2 encontrado na Figura 8. Por fim, para elucidar melhor estas questões, se faz necessário avaliar também o comportamento da matriptase ativa e uma análise de interação proteína-proteína, de modo a verificar se esta se encontra presente na membrana plasmática quando em amostras HSIL.

A Figura 9 traz informações sobre KLK5, KLK7 e LEKTI, onde pode-se observar aumento significativo de KLK5 e 7 em amostras com características HSIL e apenas uma tendência na diminuição da expressão de LEKTI, visto que não houve variação significativa. KLK5 e KLK7 são serino-proteases bem descritas frente ao seu envolvimento no desenvolvimento de carcinoma de ovário (Dong et al., 2014). Aparentemente elas auxiliam regulando proteínas de transição epitélio mesenquimal, tais como fibronectina, vitronectina, laminina, colágeno do tipo I e IV, entre outras (Dong et al., 2003 e 2014). Além disso, foi demonstrado que KLK5 é responsável pela disseminação metastática em carcinoma oral de células escamosas, uma vez que contribui clivando desmogleína-1 e promovendo perda de integridade nas junções entre células (Jiang et al., 2011). Foi descrito ainda o potencial de KLK5 em clivar e ativar PAR-2, que por sua vez estimula o aumento no nível de mRNAs pró-inflamatórios de genes associados à via NFκB, possibilitando a produção de TNF-α, IL-8, ICAM1 e TSLP (Johnson et al., 2016). Um estudo utilizando 105 amostras de câncer colorretal, das quais possuem 54 amostras normais pareadas, demonstrou expressão aumentada de KLK7 em amostras de câncer, principalmente para

tumores pouco diferenciados (Talieri et al., 2009). Além disso, eles também utilizaram 22 linhagens tumorais para confirmação destes resultados. Outra pesquisa reafirmou estes resultados e ainda demonstrou a utilização de KLK7 como marcador para predizer o prognóstico para este tipo de câncer (Talieri et al., 2009, Walker et al., 2014). Johnson e seu grupo (2007) demonstrou que a desregulação de KLK7 promove o aumento do potencial de invasão em células de câncer pancreático devido à clivagem de E-caderina por KLK7, assim liberando E-caderina solúvel no meio. Portanto, estes resultados corroboram com os achados desta dissertação, onde KLK5 e 7 encontram-se mais expressas em biópsias de lesão de alto grau, e sugerem futuras investigações a interação entre KLK7 e E-caderina dentro do contexto de amostras HSIL de colo do útero.

LEKTI tem sido descrito como um supressor tumoral. Estudos como o Wang e seu grupo (2019) tem apontado para o fato de *SPINK5*, gene que codifica LEKTI, ter sua expressão diminuída em tecidos de câncer de esôfago. Eles também associaram o aumento na expressão *SPINK5* e a inibição de proliferação, migração, e invasão através da inibição de sinalização da via Wtn/ β -catenina em células de câncer de esôfago. Isto acontece através da degradação de β -catenina pela inibição de fosforilação de GSK3 β nestas células tumorais. Apesar de LEKTI não apresentar diminuição significativa de sua expressão em lesões HSIL, explorar os intermediários da via Wtn/ β -catenina nestes tecidos e em linhagem celular pode evidenciar uma desregulação desta via em lesões pré-malignas de colo de útero.

Importantemente, muita informação encontra-se disponível na literatura sobre a associação destas serino-proteases e inibidores com diversos tipos de câncer. No entanto, pouco se sabe sobre seu perfil proteolítico em lesões pré-malignas de colo de útero em pacientes infectadas por HPV, o que justifica e coloca a presente dissertação como uma pesquisa importante na complementação deste conhecimento.

Por fim, a Figura 10 objetivou visualizar a correlação entre o aumento na expressão das serino-proteases frente à diminuição na expressão de seus inibidores cognatos em amostras de lesão HSIL. Oberst e seu grupo, em 2001, procurou estabelecer uma razão entre matriptase e HAI-1 através da técnica de western blot. Eles relataram um aumento nesta razão para tumores ginecológicos, justificando

assim matriptase como uma protease pró-tumoral. Todavia, este padrão não foi observado para tumores de cólon e em casos de câncer de mama, onde houve uma flutuação nos resultados (Oberst et al., 2001). A razão entre matriptase e HAI-2 também foi avaliada para diversas linhagens de câncer de mama, onde foi observada uma razão pelo menos 1,5 vezes maior que a razão de matriptase com HAI-1 (Chang et al., 2015). A respeito da correlação entre matriptase e HAI-1, os resultados da literatura contrastaram com os deste estudo (Figura 10A), uma vez que não houve correlação entre a expressão destas proteínas. Já para HAI-2, foi encontrada correlação fraca, positiva e não estatisticamente significativa quando comparado com matriptase em lesões HSIL (Figura 10B). Não há muitos estudos disponíveis tentando traçar este tipo relação entre KLK5 e KLK7 com LEKTI. No entanto, Leusink e seus colaboradores (2015) não encontraram correlação entre os níveis de mRNA de KLK5 e 7 com *SPINK5* para análise de metástase de linfonodos em carcinoma oral de células escamosas. Apesar destes resultados, a Figura 10D demonstrou uma correlação fraca e positiva entre KLK7 e LEKTI em um nível proteico, embora isso não tenha se confirmado para KLK5 (Figura 10C).

Por fim, os resultados da presente dissertação nos permitem verificar uma alteração na expressão de diversas serino-proteases, tais como matriptase, KLK5 e KLK7. Ainda se observou alterações na expressão de seus inibidores, HAI-1, HAI-2 e LEKTI em biópsias HSIL quando comparadas com biópsias com características histológicas normais. Ademais, interessante, o padrão de expressão das proteínas de membrana foi alterado para um padrão de expressão difuso nas biópsias HSIL. O estudo de correlação entre o aumento na expressão de protease e diminuição na expressão de inibidor cognato evidenciou uma fraca correlação positiva entre matriptase:HAI-2 e KLK7:LEKTI que, no entanto, não foram estatisticamente significantes, provavelmente devido ao pequeno número de amostras.

Aumentar o número de amostras e adicionar outros experimentos buscando a avaliação de intermediários moleculares das vias supracitadas e a correlação de proteínas virais do HPV com as proteínas aqui estudadas parecem ser promissores caminhos para o futuro deste trabalho.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na presente dissertação nos permitem concluir que:

- A expressões das serino-proteases Matriptase, Calicreína-5 (KLK5) e Calicreína-7 (KLK7), juntamente com os inibidores HAI-1 e HAI-2, sofreram alterações significativas em biópsias de lesões de alto grau (HSIL) quando comparadas com biópsias de características histológicas normais. As lesões HSIL, portanto, modulam a expressão destas proteínas;
- Matriptase, HAI-1 e HAI-2 possuem padrões de expressão proteica diferenciados entre tecido normal e lesões HSIL. Em tecidos normais, há predominância de expressão na membrana plasmática. Na lesão HSIL, por outro lado, a expressão se torna predominantemente mais difusa na célula;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMONTE, M. et al. Risk factors for Human Papillomavirus Exposure and Co-factors for Cervical Cancer in Latin America and the Caribbean. **Vaccine**, v. 26, n. SUPPL. 11, 19 ago. 2008.

BABA, T. et al. Loss of membrane-bound serine protease inhibitor HAI-1 induces oral squamous cell carcinoma cells' invasiveness. **Journal of Pathology**, v. 228, n. 2, p. 181–192, out. 2012.

BENARD, V. B. et al. Cervical carcinoma rates among young females in the United States. **Obstetrics and gynecology**, v. 120, n. 5, p. 1117–23, Nov. 2012.

BERGUM, C.; LIST, K. Loss of the matriptase inhibitor HAI-2 during prostate cancer progression. **The Prostate**, v. 70, n. 13, p. 1422–1428, 15 set. 2010.

BERNARD, H. U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70–79, maio 2010.

BERNARD, H. U. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. **Antiviral Therapy**, v. 7, n.4, p. 219–237, dez. 2002.

BITOUN, E. et al. LEKTI proteolytic processing in human primary keratinocytes, tissue distribution and defective expression in Netherton syndrome. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 19, p. 2417–2430, 1 out. 2003.

BOUVARD, V. et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. The lancet oncology. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 4, p. 321–322, abr. 2009.

BRATTSAND, M. et al. A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 124, n. 1, p. 198–203, 2005.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, Nov. 2018.

BUCK, C. B. et al. Arrangement of L2 within the Papillomavirus Capsid. **Journal of Virology**, v. 82, n. 11, p. 5190–5197, 1 jun. 2008.

- CASTLE, P. E. et al. An analysis of high-risk human papillomavirus DNA-negative cervical precancers in the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). **Obstetrics and Gynecology**, v. 111, n. 4, p. 847–856, abr. 2008.
- CERA, E. DI. Serine Proteases. **IUBMB Life**, v. 61, n. 5, p. 510-515, maio. 2009.
- CERQUEIRA, C. et al. Kallikrein-8 Proteolytically Processes Human Papillomaviruses in the Extracellular Space to Facilitate Entry into Host Cells. **Journal of virology**, v. 89, n. 14, p. 7038–52, Jul. 2015.
- CHANG, H.-H. D. et al. Differential Subcellular Localization Renders HAI-2 a Matriptase Inhibitor in Breast Cancer Cells but Not in Mammary Epithelial Cells. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. 1-16, mar. 2015.
- CHEN, J. Q.; RUSSO, J. Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1826, n. 2, p. 370-384, Jun. 2012.
- CHENG, H. et al. Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 regulates epithelial to mesenchymal transition through membrane-bound serine proteinases. **Cancer Research**, v. 69, n. 5, p. 1828–1835, 1 mar. 2009.
- CHENG, M. F. et al. Expression of EMMPRIN and matriptase in esophageal squamous cell carcinoma: Correlation with clinicopathological parameters. **Diseases of the Esophagus**, v. 19, n. 6, p. 482–486, dez. 2006.
- CHENG, M. F. et al. Expression of matriptase correlates with tumour progression and clinical prognosis in oral squamous cell carcinoma. **Histopathology**, v. 65, n. 1, p. 24–34, 2014.
- CHOU, F. P. et al. Imbalanced matriptase pericellular proteolysis contributes to the pathogenesis of malignant B-Cell lymphomas. **American Journal of Pathology**, v. 183, n. 4, p. 1306–1317, out. 2013.
- CHOW, L. T. et al. A highly efficient system to produce infectious human papillomavirus: Elucidation of natural virus-host interactions. **Cell Cycle**, v. 8, n. 9, p. 1319–1323, 1 maio 2009.

CLEMENTS, J. et al. The expanded human kallikrein (KLK) gene family: Genomic organisation, tissue-specific expression and potential functions. **Biological Chemistry**, v. 382, n. 1, p. 5-14, jan. 2001.

DANOS, O.; KATINKA, M.; YANIV, M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. **The EMBO Journal**, v. 1, n. 2, p. 231–236, fev. 1982.

DARRAGH, T. M. et al. The lower anogenital squamous terminology standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the college of american pathologists and the american society for colposcopy and cervical pathology. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 136, n. 10, p. 1266–1297, out. 2012.

DEFILIPPIS, R. A. et al. Endogenous Human Papillomavirus E6 and E7 Proteins Differentially Regulate Proliferation, Senescence, and Apoptosis in HeLa Cervical Carcinoma Cells. **Journal of Virology**, v. 77, n. 2, p. 1551–1563, 15 jan. 2003.

DERAISON, C. et al. LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, n. 9, p. 3607–3619, set. 2007.

DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, 20 jun. 2004.

DINC, B. et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV) and HPV-16 genotyping by real-time PCR in patients with several cervical pathologies. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 19–23, 2010.

DONG, Y. et al. Differential splicing of KLK5 and KLK7 in epithelial ovarian cancer produces novel variants with potential as cancer biomarkers. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 5, p. 1710–20, maio 2003.

DONG, Y. et al. Metastasis of ovarian cancer is mediated by kallikrein related peptidases. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 31, n. 1, p. 135-147, set. 2014.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, v. 110, n. 5, p. 252-241, maio 2006.

DOORBAR, J.; GALLIMORE, P. H. Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a. **Journal of virology**, v. 61, n. 9, p. 2793–9, set. 1987.

EGELRUD, T. et al. hK5 and hK7, two serine proteinases abundant in human skin, are inhibited by LEKTI domain 6. **British Journal of Dermatology**, v. 153, n. 6, p. 1200–1203, dez. 2005.

FARIDI, R. et al. Oncogenic potential of human papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. **Virology Journal**, v. 269, n. 8, p. 1-8, jun. 2011.

FEHRMANN, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**, v. 22, p. 5201–5207, 2003.

FERRECCIO, C. et al. A comparison of single and combined visual, cytologic, and virologic tests as screening strategies in a region at high risk of cervical cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 12, n. 9, p. 815–823, 1 set. 2003.

FIDLER, M. M. et al. Articles Cancer incidence and mortality among young adults aged 20-39 years worldwide in 2012: a population-based study. **Lancet Oncol**, v. 18, p. 1579–89, 2017.

FORMAN, D. et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. **Vaccine**, v. 30, n. Suppl 5, p. 12-23, nov. 2012.

FRIIS, S. et al. A Matriptase-Prostasin Reciprocal Zymogen Activation Complex with Unique Features: Prostasin as a Non-Enzymatic Co-Factor for Matriptase Activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 26, p. 19028-19039, jun. 2013.

FRIIS, S. et al. Matriptase zymogen supports epithelial development, homeostasis and regeneration. **BMC Biology**, v. 15, n. 1, 1 jun. 2017.

FUKUSHIMA, T. et al. Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 suppresses metastatic pulmonary colonization of pancreatic carcinoma cells. **Cancer Science**, v. 102, n. 2, p. 407–413, fev. 2011.

GIARRÈ, M. et al. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle Arrest. **Journal of virology**, v. 75, n. 10, p. 4705–12, maio 2001.

GOFFIN, F. et al. High-risk human papillomavirus infection of the genital tract of women with a previous history or current high-grade vulvar intraepithelial neoplasia. **Journal of Medical Virology**, v. 78, n. 6, p. 814–819, 2006.

GOODMAN, A. HPV testing as a screen for cervical cancer. **BMJ (Online)**, v. 350, 30 jun. 2015.

HALL, A. et al. Dysfunctional oxidative phosphorylation makes malignant melanoma cells addicted to glycolysis driven by the V600EBRAF oncogene. **Oncotarget**, v. 4, n. 4, p. 584–599, 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 4 mar. 2011.

HEDSTROM, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501-4524, Dez. 2002.

HONG, Z. et al. The solution structure of the MANEC-type domain from hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 reveals an unexpected PAN/apple domain-type fold. **Biochemical Journal**, v. 466, p. 299–309, 1 mar. 2015.

IARC – OMS. Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical: Manual para principiantes. Disponível em: <<https://screening.iarc.fr/colpochap.php?chap=1&lang=4>>. Acesso em: 24 out. 2019.

IARC–OMS - 2018 - Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2019.

INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2018. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>>. Acesso em: 21 Nov. 2019.

JAYAKUMAR, A. et al. LEKTI, a physiological inhibitor of multiple serine proteinases, blocks migration and invasion of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells. 2014. TIAN, X. et al. Expression of human kallikrein 7 (hK7/SCCE) and its

inhibitor antileukoprotease (ALP/SLPI) in uterine endocervical glands and in cervical adenocarcinomas. **Oncology Reports**, v. 12, n. 5, p. 1001–1006, nov. 2004.

JAYAKUMAR, A. LEKTI, A Physiological Inhibitor of Multiple Serine Proteinases, Suppresses Perineural and Lymphovascular Invasion of Human Head and Neck Cancer Cells in A Mouse Orthotopic Model. **MOJ Proteomics & Bioinformatics**, v. 1, n. 5, 11 nov. 2014.

JEON, S.; ALLEN-HOFFMANN, B. L.; LAMBERT, P. F. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. **Journal of virology**, v. 69, n. 5, p. 2989–97, maio 1995.

JIANG, R. et al. Kallikrein-5 promotes cleavage of desmoglein-1 and loss of cell-cell cohesion in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 11, p. 9127–9135, 18 mar. 2011.

JIANG, W. G. Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor, its activator, inhibitors and the c-Met receptor in human cancer cells. **International journal of oncology**, v. 19, n. 4, p. 857–863, 2001.

JOHNSON, J. J. et al. Protease-activated Receptor-2 (PAR-2)-mediated Nf-B Activation Suppresses Inflammation-associated Tumor Suppressor MicroRNAs in Oral Squamous Cell Carcinoma. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 13, p. 6936-6945, mar. 2016.

JOHNSON, S. K. et al. Kallikrein 7 enhances pancreatic cancer cell invasion by shedding E-cadherin. **Cancer**, v. 109, n. 9, p. 1811–1820, 1 maio 2007.

KANEMARU, A. et al. Deregulated matriptase activity in oral squamous cell carcinoma promotes the infiltration of cancer-associated fibroblasts by paracrine activation of protease-activated receptor 2. **International Journal of Cancer**, v. 140, n. 1, p. 130–141, 1 jan. 2017.

KAWAGUCHI, T. et al. Purification and cloning of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2, a Kunitz-type serine protease inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 44, p. 27558–27564, 31 out. 1997.

KIVI, N. et al. Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. **Oncogene**, v. 27, n. 18, p. 2532–2541, 17 abr. 2008.

KULMALA, S.-M. et al. Human Papillomavirus Testing with the Hybrid Capture 2 Assay and PCR as Screening Tools. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 42, n. 6, p. 2470–2475, 2004.

LARSEN, B. R. et al. Hepatocyte growth factor activator inhibitor-2 prevents shedding of matriptase HHS Public Access. **Exp Cell Res**, v. 319, n. 6, p. 918–929, 2013.

LAVIGNE, A. W. et al. Cervical cancer in low and middle income countries: Addressing barriers to radiotherapy delivery. **Gynecologic Oncology Reports**, v. 22, p. 16-20, nov. 2017.

LECHNER, M. S.; LAIMINS, L. A. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. **Journal of Virology**, v. 68, n. 7, p. 4262–4273, 1994.

LEE, J. W. et al. Increased expression of matriptase is associated with histopathologic grades of cervical neoplasia. **Human Pathology**, v. 36, n. 6, p. 626–633, jun. 2005.

LEE, S. L.; DICKSON, R. B.; LIN, C. Y. Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 47, p. 36720–5, 24 nov. 2000.

LEE, S.-P. et al. Tissue distribution and subcellular localizations determine in vivo functional relationship among prostasin, matriptase, HAI-1, and HAI-2 in human skin. **PLOS ONE**, v. 13, n. 2, p. e0192632, 13 fev. 2018.

LEI, S. et al. Expression and clinical significance of KLK5-8 in endometrial cancer. **American journal of translational research**, v. 11, n. 7, p. 4180–4191, 2019.

LEUSINK, F. K. J. et al. The Co-Expression of Kallikrein 5 and Kallikrein 7 Associates with Poor Survival in Non-HPV Oral Squamous-Cell Carcinoma. **Pathobiology**, v. 82, n. 2, p. 58–67, 2015.

LIST, K. et al. Delineation of matriptase protein expression by enzymatic gene trapping suggests diverging roles in barrier function, hair formation, and squamous

cell carcinogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 168, n. 5, p. 1513–1525, 2006.

LIST, K. et al. Deregulated matriptase causes ras-independent multistage carcinogenesis and promotes ras-mediated malignant transformation. **Genes and Development**, v. 19, n. 16, p. 1934–1950, 15 ago. 2005.

LIST, K. et al. Matriptase/MT-SP1 is required for postnatal survival, epidermal barrier function, hair follicle development, and thymic homeostasis. **Oncogene**, v. 21, n. 23, p. 3765–3779, 23 maio 2002.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 45, p. 30433–30437, 23 jul. 2008.

MAEURER, M. J. et al. Tumor escape from immune recognition: Lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 7, p. 1633–1641, 1 out. 1996.

MASSIMI, P. et al. HPV E6 degradation of p53 and PDZ containing substrates in an E6AP null background. **Oncogene**, v. 27, n. 12, p. 1800–1804, 13 mar. 2008.

MEYER-HOFFERT, U. Reddish, scaly, and itchy: How proteases and their inhibitors contribute to inflammatory skin diseases. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 57, n. 5, p. 345-354, out. 2009.

MITCHELL, K. J. et al. Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. **Nature Genetics**, v. 28, n. 3, p. 241–249, 2001.

MUNN, D. H. et al. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. **Science**, v. 297, n. 5588, p. 1867–1870, 13 set. 2002.

NAKAMURA, K. et al. Expression of matriptase and clinical outcome of human endometrial cancer. **Anticancer Research**, v. 29, n. 5, p. 1685–1690, maio 2009.

NAKAMURA, K. et al. Hepatocyte growth factor activator inhibitor-2 (HAI-2) is a favorable prognosis marker and inhibits cell growth through the apoptotic pathway in cervical cancer. **Annals of Oncology**, v. 20, n. 1, p. 63–70, 2009.

NAKAMURA, K. et al. The role of hepatocyte growth factor activator inhibitor (HAI)-1 and HAI-2 in endometrial cancer. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 11, p. 2613–2624, 1 jun. 2011.

NETTER, F. H. **Atlas of human anatomy**. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier. 2011.

NONBOE, A. W. et al. HAI-2 stabilizes, inhibits and regulates SEA-cleavage-dependent secretory transport of matriptase. **Traffic**, v. 18, n. 6, p. 378–391, 1 jun. 2017.

OBERST, M. et al. Matriptase and HAI-1 Are Expressed by Normal and Malignant Epithelial Cells in Vitro and in Vivo. **American Journal of Pathology**. v. 158, n. 4, p. 1301-1311, abri. 2001.

OBERST, M. D. et al. Expression of the serine protease matriptase and its inhibitor HAI-1 in epithelial ovarian cancer: Correlation with clinical outcome and tumor clinicopathological parameters. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 4, p. 1101–1107, 1 abr. 2002.

OBERST, M. D. et al. HAI-1 regulates activation and expression of matriptase, a membrane-bound serine protease. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 289, n. 2 58-2, ago. 2005.

OMS – 2018 - *Cervical cancer*. Disponível em: <<https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/cervical-cancer/en/>>. Acesso em: 10 out. 2020.

PARK, D. S. et al. Involvement of retinoblastoma family members and E2F/DP complexes in the death of neurons evoked by DNA damage. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 9, p. 3104–14, 1 maio 2000.

PATEL, A. et al. Cervical cancer incidence in young women: A historical and geographic controlled UK regional population study. **British Journal of Cancer**, v. 106, n. 11, p. 1753–1759, 22 maio 2012.

RYAN, B. M.; FAUPEL-BADGER, J. M. The hallmarks of premalignant conditions: A molecular basis for cancer prevention. **Seminars in Oncology**, v. 43, n. 1, p. 22-35, 1 fev. 2016.

SALES, K. U. et al. Matriase initiate activation of epidermal pro-kallikrein and disease onset. **Nature genetics**, v. 42, n. 8, p. 676–683, 2010.

SALES, K. U. et al. Matriptase promotes inflammatory cell accumulation and progression of established epidermal tumors. **Oncogene**, v. 34, n. 35, p. 4664–4672, 27 ago. 2015.

SALES, K. U. et al. Non-hematopoietic PAR-2 is essential for matriptase-driven premalignant progression and potentiation of ras-mediated squamous cell carcinogenesis. **Oncogene**, v. 34, n. 3, p. 346–356, 27 jan. 2015.

SANTIN, A. D. et al. The serine protease stratum corneum chymotryptic enzyme (kallikrein 7) is highly overexpressed in squamous cervical cancer cells. **Gynecologic Oncology**, v. 94, n. 2, p. 283–288, ago. 2004.

SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N. Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 22, n. 4, p. 553–560, abr. 2013.

SCHINDELIN, J. et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676-682, jun. 2012.

SHAW, J. L. V.; DIAMANDIS, E. P. A potential role for tissue kallikrein-related peptidases in human cervico-vaginal physiology. **Biological Chemistry**, v. 389, n. 6, p. 681-688, 1 jun. 2008.

SHI, Y. E. et al. Identification and Characterization of a Novel Matrix-degrading Protease from Hormone-dependent Human Breast Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 53, n. 6, p. 1409–1415, 1993.

SHIMOMURA, T. et al. Hepatocyte growth factor activator inhibitor, a novel Kunitz-type serine protease inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 10, p. 6370–6376, 7 mar. 1997.

SHUKLA, S. et al. Physical state & copy number of high risk human papillomavirus type 16 DNA in progression of cervical cancer. **Indian Journal of Medical Research**, v. 139, n. APR, p. 531–543, 2014.

SIDDIQA, A. et al. The human papillomavirus type 16 L1 protein directly interacts with E2 and enhances E2-dependent replication and transcription activation. **The Journal of general virology**, v. 96, n. 8, p. 2274–85, ago. 2015.

SMITH, J. S. et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 3, p. 621–632, 1 ago. 2007.

STANLEY, M. HPV - Immune response to infection and vaccination. **Infectious Agents and Cancer**, v. 5, n. 19, p. 1-6, out. 2010.

SZABO, R. et al. Potent inhibition and global co-localization implicate the transmembrane Kunitz-type serine protease inhibitor hepatocyte growth factor activator inhibitor-2 in the regulation of epithelial matriptase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 43, p. 29495–29504, 24 out. 2008.

SZABO, R. et al. C-Met-induced epithelial carcinogenesis is initiated by the serine protease matriptase. **Oncogene**, v. 30, n. 17, p. 2003–2016, 28 abr. 2011.

SZABO, R.; BUGGE, T. H. Membrane-Anchored Serine Proteases in Vertebrate Cell and Developmental Biology. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, p. 213-235, 2011.

TAKEUCHI, T. et al. Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 34, p. 26333–26342, 25 ago. 2000.

TALIERI, M. et al. Clinical significance of kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) in colorectal cancer. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 101, n. 4, p. 741–747, abr. 2009.

The Cell - The Development and Causes of Cancer - 2000 - NCBI Bookshelf. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>>. Acesso em: 20 out. 2019.

The Human Protein Atlas - KLK5 protein expression summary.. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000167754-KLK5>>. Acesso em: 30 nov. 2019.

The Human Protein Atlas - KLK7 protein expression summary. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000169035-KLK7>>. Acesso em: 30 nov. 2020.

TSAI, C. H. et al. HAI-2 suppresses the invasive growth and metastasis of prostate cancer through regulation of matriptase. **Oncogene**, v. 33, n. 38, p. 4643–4652, 18 set. 2014.

UHLAND, K. Matriptase and its putative role in cancer. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 63, n. 24, p. 2968–78, dez. 2006.

UHLAND, K. et al. Use of IHC and newly designed matriptase inhibitors to elucidate the role of matriptase in pancreatic ductal adenocarcinoma. **International journal of oncology**, v. 35, n. 2, p. 347–57, ago. 2009.

VOGEL, L. K. et al. The ratio of matriptase/HAI-1 mRNA is higher in colorectal cancer adenomas and carcinomas than corresponding tissue from control individuals. **BMC Cancer**, v. 6, 4 jul. 2006.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. **The multistep nature of cancer** *Trends in Genetics*, 1993.

WALKER, F. et al. Kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) is a proliferative factor that is aberrantly expressed in human colon cancer. **Biological Chemistry**. v. 395, n. 9, p. 1075-1086, 1 set. 2014.

WANG, Q. et al. A novel tumor suppressor SPINK5 targets Wnt/ β -catenin signaling pathway in esophageal cancer. **Cancer Medicine**, v. 8, n. 5, p. 2360–2371, 13 maio 2019.

WILSON, R. et al. The full-length E1^{E4} protein of human papillomavirus type 18 modulates differentiation-dependent viral DNA amplification and late gene expression. **Virology**, v. 362, n. 2, p. 453–460, 5 jun. 2007.

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

WU, M. H.; WU, B. Y.; WANG, J. K. Matriptase and its cognate inhibitor, HAI-1, in normal skin and its appendages. **Journal of Medical Sciences**, v. 31, n. 2, p. 75–78, 2011.

WU, S. R. et al. The Kunitz Domain i of Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor-2 Inhibits Matriptase Activity and Invasive Ability of Human Prostate Cancer Cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

YAMAUCHI, M. et al. Hepatocyte growth factor activator inhibitor types 1 and 2 are expressed by tubular epithelium in kidney and down-regulated in renal cell carcinoma. **Journal of Urology**, v. 171, n. 2 I, p. 890–896, 2004. PARR, C.;

YANG, Y. et al. Molecular Imaging of Proteases in Cancer. **Cancer Growth and Metastasis**, v. 2, p. 13-27, jan. 2009.

YE, J. et al. Loss of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 participates in metastatic spreading of human pancreatic cancer cells in a mouse orthotopic transplantation model. **Cancer Sci**, v. 105, n. 1, p. 44–51, 2014.

ZHENG, Z. M.; BAKER, C. C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 2286-2302, set. 2006.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **International Journal of PharmTech Research**, v. 9, n. 10, p. 342–350, 2002.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo I: Parecer de aprovação do projeto pelo Comitê de ética em Pesquisa do HCRP-USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: MODULAÇÃO DO PERFIL PROTEOLÍTICO EM LESÕES PRÉ-MALIGNAS DE COLO DO ÚTERO EM PACIENTES CO-INFECTADAS COM HPV E HIV

Pesquisador: RODRIGO ALBERTO ALVES DA SILVA

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 04045118.8.0000.5440

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RPUSP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.130.450

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Anexo II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e para Guarda de Material Biológico – Pacientes Soronegativas para HIV

Nós, Katiuchia Uzzun Sales, Silvana Maria Quintana e Rodrigo Alberto Alves da Silva convidamos a Sra.

____a participar do projeto: **MODULAÇÃO DO PERFIL PROTEOLÍTICO EM LESÕES PRÉ-MALIGNAS DE COLO DO ÚTERO EM PACIENTES CO-INFECTADAS COM HPV E HIV**. Este trabalho quer estudar: (1) as feridas pré-câncer que podem ocorrer no colo do útero por causa da infecção pelo vírus HPV; (2) se há alguma molécula responsável pela piora (associadas ao câncer) destas feridas e (3) se há diferença nestas moléculas em pacientes soropositivas para HIV e soronegativas para HIV. A senhora está sendo convidada a participar pois possui entre 18-55 anos de idade e possui uma ferida causada pelo vírus HPV. O estudo será feito por meio de: coleta de dois fragmentos pequenos (biópsia) de aproximadamente 4 mm do seu colo do útero. Um destes será da ferida e o outro de uma área sem ferida (área normal). Para isso, será feita anestesia local por uma médica, seguida da retirada da biópsia com uma pinça de biópsia. Será realizado, na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, o estudo destas biópsias para analisar a presença das seguintes moléculas envolvidas nas feridas: Matriptase, KLK 5, KLK 7, HAI-1, HAI-2 e LEKTI. Esta informação poderá ajudar a entender melhor como estas feridas acontecem e a compreender a associação destas feridas com o câncer. O acesso aos resultados do estudo de sua biópsia estará disponível para seu conhecimento. Da mesma forma, você pode optar por não tomar conhecimento destes resultados. Todo material excedente, se existir, será descartado em observância às normas vigentes, respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do participante da pesquisa, após os estudos serem completados. **As amostras colhidas serão armazenadas em parafina por 30 meses, tempo necessário para a execução deste projeto e publicação de seus resultados. Esta pesquisa está vinculada ao biorrepositório chamado “BIORREPOSITÓRIO PARA A PESQUISA “MODULAÇÃO DO PERFIL PROTEOLÍTICO EM LESÕES PRÉ-MALIGNAS DE COLO DO ÚTERO EM PACIENTES CO-INFECTADAS COM HPV E HIV”, criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto ou na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP**

com o objetivo de armazenar as duas biópsias de colo do útero de cada paciente. Estas biópsias serão incluídas em parafina, os blocos contendo as biópsias serão cadastrados e armazenados em caixas devidamente fechadas e acondicionadas em temperatura ambiente. Este armazenamento será cuidadosamente realizado, visto que a utilização destas amostras se faz necessária nesta pesquisa para o entendimento da relação entre o nível de proteases e o grau da lesão causada pelo HPV. Gostaríamos de convidá-la a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico humano de colo de útero (biópsias) para fins de pesquisa e análise científica. A senhora pode, em qualquer momento, requisitar o descarte desse material, mesmo antes do término desta pesquisa (a qualquer tempo e sem ônus ou prejuízos para o seu diagnóstico, encaminhamento e tratamento). A retirada do consentimento será formalizada em manifestação, por escrito e assinada, pela senhora ou seu representante legal, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes, bem como as informações associadas a elas. Gostaríamos de te informar também que os resultados do estudo serão utilizados para fins científicos e serão divulgados em eventos, revistas e meios de comunicação, no entanto, você terá a segurança de não ser identificada em nenhum momento e de que será mantido o caráter confidencial de todas as informações relacionadas à sua privacidade. Você fará exames que fazem parte da rotina do ambulatório de moléstias infectocontagiosas onde você faz o seguimento. A coleta da biópsia para a pesquisa não aumentará os riscos para a sua saúde, porém pode aumentar o tempo necessário para os exames que ocorrerão no ambulatório. Poderá apenas haver um desconforto/dor e/ou sangramento devido ao procedimento de coleta da biópsia, no entanto este é um procedimento normal dentro deste ambulatório e será seguido segundo os passos padronizados. Entretanto, os pesquisadores garantem o acompanhamento, tratamento, assistência integral gratuita; além de indenizações em caso eventual de danos diretos/indiretos, imediatos/tardios, decorrentes de sua participação na pesquisa, de acordo com as leis vigentes, e o reembolso de despesas (transporte, alimentação e outras despesas) decorrentes da sua participação no estudo, nos termos da Resolução CNS 466/2012. A sua participação na pesquisa não trará benefícios diretos para a senhora, porém contribuirá para a melhor compreensão do mecanismo envolvido na formação destas feridas, tendo em

vista que este estudo busca um melhor entendimento de algumas proteínas associadas a estas feridas pré-malignas, em pacientes com HPV e HPV/HIV.

As pessoas que farão seu atendimento serão: Dra. Silvana Maria Quintana e sua equipe de médicos e residentes. Caso a Sra. apresente alguma dúvida sobre esta pesquisa, a Sra. pode entrar em contato com Silvana Maria Quintana, pelos telefones (016) 3602-2804, 3602-2587 ou e-mail quintana@fmrp.usp.br, Katiuchia Uzzun Sales, pelo telefone (016) 3315-9263 ou pelo e-mail salesk@fmrp.usp.br, ou com Rodrigo Alberto Alves da Silva, pelo telefone (016) 3315-9263 ou pelo e-mail alvesdas.rodrigo@usp.br. A sua autorização não é obrigatória, e a Sra. poderá desistir a qualquer momento, retirando o seu consentimento. A não autorização deste trabalho não trará nenhum prejuízo em sua relação com o profissional ou com o Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e/ou Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Este termo assegura a garantia de manutenção do sigilo e da privacidade dos participantes da pesquisa, e proteção contra qualquer tipo de prejuízo, discriminação ou estigmatização, individual ou coletiva; será garantida durante todas as fases da pesquisa. Os seus dados individuais e resultados serão protegidos através do sigilo das suas informações pessoais (a senhora será identificada através de número e seus dados pessoais serão mantidos em sigilo), através de senhas em documentos eletrônicos e gavetas com chaves para documentos impressos. Ainda, você receberá uma via deste termo, com o contato de cada pesquisador e da secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP/USP. Caso tenha alguma dúvida sobre o estudo, a Sra. poderá entrar em contato com os profissionais a qualquer momento, antes, durante ou após a realização do estudo. Além disso, a Sra. terá tempo necessário para refletir e consultar familiares ou outras pessoas de sua confiança para avaliar se deseja ou não participar do estudo.

Este documento será assinado pelas profissionais Silvana Maria Quintana e Katiuchia Uzzun Sales, e caso haja mais de uma página, as primeiras páginas devem ser rubricadas e a última assinada por todos os profissionais e pela Sra. Além disso, os dados obtidos neste estudo não serão usados em outra pesquisa sem novo consentimento da Sra.

Em caso de insatisfações ou reclamações, você poderá entrar em contato com a secretária do CEP, e seu nome será mantido em anonimato.

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP, Campus Universitário – Monte Alegre; Atendimento das 8:00h às 17:00h por meio do telefone 16-3602-2228.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação no estudo e concordo em participar.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____ data: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ data: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ data: _____

Dados do responsável legal ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____

Assinatura: _____ data: _____