UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Análise da expressão da metaloproteinase de matriz do
tipo 9 em esfregaços cérvico-vaginais: um estudo
citopatológico.

Erika Regina Matheus

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE
Orientadora: Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler

São Paulo

2011

Erika Regina Matheus

Análise da expressão da metaloproteinase de matriz do tipo 9 em
esfregaços cérvico-vaginais: um estudo citopatológico.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Silvy Maria Stuchi Engler
Orientadora/presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, _____ **de** _____

COLABORADORES

Esta dissertação foi realizada em colaboração com o Dr. Antônio Carlos Campos Pignatari e com o Prof. Marco Antonio Zonta, do Laboratório de Infectologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), juntamente com o Laboratório IN CITO Citologia Diagnóstica.

DEDICATÓRIAS

À toda minha família, pelo apoio e dedicação.

À minha mãe, Iara, que mesmo nas dificuldades, sempre buscou o melhor pra mim.

*Ao Rafael, meu noivo, amigo e companheiro, que diverte meus dias e nunca me
deixa só.*

*E especialmente ao meu pai, Mario, que teve uma nova chance para me ver concluir
mais esta etapa.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que esteve comigo em todos os problemas durante o mestrado, principalmente os pessoais, e que me manteve de pé para continuar.

À minha orientadora, Dra. Silvy Maria-Engler, que sempre me deu liberdade para conversar e mais do que isso, que me confiou este projeto e uma vaga no seu laboratório. Obrigada professora, por ter, principalmente, investido em um projeto tão fora do foco do laboratório, por ter acreditado no projeto e na minha capacidade de exercê-lo, frente a todas as dificuldades que enfrentamos, e por ser sempre uma orientadora tão dedicada, exigente e focada.

À minha família, meus tios, minhas primas, meus priminhos, meu vô, e em especial minhas avós Idinéia e Júlia que me agradam de todas as formas principalmente com suas comidinhas e à minha tia Magda, por estarem sempre ao meu lado me incentivando e apoiando, não importam quais sejam as minhas decisões e por terem um papel fundamental na minha criação.

Aos meus pais Mario e Iara, por serem minha base e por quererem e lutarem sempre por um futuro melhor pra mim. Meu pai, por ser aquela pessoa que eu sei que sempre vou poder encontrar uma brincadeira, uma descontração e um apoio. Ele, melhor do que ninguém, por todos os problemas de saúde que passou durante meu projeto, merece me ver concluir este trabalho. Minha mãe, a melhor amiga e mãe que eu poderia ter, que abdicou de muitas coisas nesses anos pela minha formação e que está sempre do meu lado. Tudo que eu faço, é para dar orgulho para vocês.

Ao Rafael, meu noivo, que em momento algum sai do meu lado, que tenta entender o que é Imunocitoquímica, que fica comigo vendo figuras de células, que já me esperou até tarde no laboratório, por me ensinar várias coisas importantes, que aprendeu o que é o exame de Papanicolaou e sabe tudo sobre HPV. Obrigado por ser, hoje, meu porto seguro, quem ameniza meus problemas e me ajuda em todas as soluções. Aos meus sogros Beatriz e Carlos, por sempre me abrigarem.

Às minhas amigas que divertem meus dias e nunca deixam de me amparar; Blandina, Bruna, Egles, Nathália, Raquel e Thalita, vocês são mais que amigas.

À Prof^a. Silvia Berlanga, por todo apoio aos alunos, que influencia diretamente em todos os projetos e na evolução do laboratório.

Ao Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari, nosso colaborador, pela oportunidade desta colaboração e por toda hospitalidade frente ao meu projeto.

Ao Prof. Marco Antonio Zonta, sempre tão solícito abrindo as portas do IN CITO para a realização do meu projeto. Obrigado por ser sempre tão divertido e informal. Com você eu não só aprendi muito, mas me apaixonei ainda mais pela citologia.

À equipe do Laboratório IN CITO, em especial as sócias Pricila Paruci, minha fiel companheira de coleta na Penitenciária e à Priscila Hyppolito, por serem sempre tão carinhosas me chamando de Erikinha, obrigada pela receptividade e pelos ensinamentos.

À Penitenciária Feminina de Sant'ana, por permitir que nossa coleta fosse realizada lá.

À Dr^a. Laura Beatriz da Silva Cardeal, Laurinha, sempre disposta a me ajudar. Com a sua paciência você me transmitia calma para aprender e resolver os problemas. Obrigada por sempre me ouvir com fidelidade, me aconselhar, por me ensinar com tanto profissionalismo e em muitos momentos compartilhar assuntos pessoais. Você foi como uma mentora, e mais que isso, você se tornou uma amiga.

A todos do Laboratório; Camila Marinho, Camis você é sem dúvida a alma do lab; Diogo Rivelli, obrigado por todas as dúvidas tiradas que me salvaram e me ajudaram muitas vezes. Não menos importante, Andréia Fruet, Bianca Ferrucio, Carla Brohem (com sua sinceridade), Fernanda Fillipin (com sua amizade), Kely Turra, Manuela Tiago (Manu com sua espontaneidade), Mariana Bartié, Paula Ferreira, Raquel Haga (com sua calma), Renato Massaro (com sua disposição em ajudar), Rebeca Almeida, me divirto e aprendo com vocês diariamente.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, pelo apoio e prontidão dos funcionários e alunos e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo apoio financeiro e espaço físico.

Ao CNPQ (Processo nº 135063/2009-4), a CAPES e à FAPESP, pelo suporte financeiro.

A todas as pessoas que de qualquer maneira me ajudaram e incentivaram a realizar este trabalho.

Obrigado!

“Eu acredito demais na sorte. E tenho constatado que, quanto mais duro eu trabalho, mais sorte eu tenho.”

Thomas Jefferson

“Enquanto suspiramos por uma vida sem dificuldades, devemos nos lembrar que o carvalho cresce forte através de ventos contrários e que os diamantes são formados sob pressão.”

Peter Marshall

RESUMO

MATHEUS, E.R. **Análise da expressão da metaloproteinase de matriz do tipo 9 em esfregaços cérvico-vaginais: um estudo citopatológico.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O Papilomavírus Humano (HPV), da família *Papillomaviridae*, são vírus epiteliotrópicos que provocam lesões de pele ou mucosa. O carcinoma do colo uterino é uma das principais causas de morte de mulheres em todo o mundo, sendo a infecção pelo HPV o principal fator de risco para o desenvolvimento do carcinoma cervical. Durante o processo maligno, a migração descontrolada de células neoplásicas, é uma característica fundamental da invasão tumoral, sendo que as metaloproteinases de matriz (MMPs) participam largamente deste processo pois são responsáveis pela clivagem de proteínas da matriz extracelular. O projeto propôs investigar a expressão de MMP-9 total em amostras cérvico-vaginais com inflamação, lesão e tumor. Foram coletadas duas amostras cérvico-vaginais como esfregaços para diagnóstico citológico e imunocitoquímica. A coleta foi realizada em 630 pacientes da Penitenciária Feminina de Sant´ana, no período de agosto de 2009 a agosto de 2010. As lâminas foram submetidas à imunocitoquímica para detecção da expressão de MMP-9. Os resultados indicaram um aumento da expressão de MMP-9 total diretamente proporcional com o aumento do grau das lesões nos esfregaços, corroborando com dados de histologia da literatura. Portanto, tal método de correlação de MMP-9 total com esfregaços cérvico-vaginais poderá auxiliar o prognóstico em esfregaços.

Palavras-chaves: HPV, carcinoma cervical, MMP, imunocitoquímica, citologia.

ABSTRACT

MATHEUS, E.R. **Evaluation of the expression of matrix metalloproteinase type 9 in cervicovaginal smears: a cytological study.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The Human Papillomavirus (HPV) are epitheliotropic viruses from family Papillomaviridae, which cause skin or mucous lesions. Carcinoma of the cervix is a major cause of death in women worldwide, and HPV infection a major risk factor for development of cervical carcinoma. During the malignant process, cell migration is a fundamental characteristic of tumor invasion, and the matrix metalloproteinases (MMPs) are responsible for the cleavage of extracellular matrix proteins. This project aims to investigate the expression of MMP-9 in different degrees of injury in the smear. We collected two cervical smears for cytological diagnosis and immunocytochemistry. Data collection was conducted in 630 women of the Sant'ana Women's Penitentiary, during the period August 2009 to August 2010. The slides were submitted to immunocytochemistry to detect the expression of MMP-9 and noticed an increase in protein expression in parallel with the increased lesions grade, which corroborates the histology of the literature and could be a method prognostic aid in vaginal smears.

.

Keywords: HPV, cervical carcinoma, MMP, immunocytochemistry, cytology.

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1. Organização genômica do HPV contendo uma região não codificadora (LCR), uma região precoce ou “Early” e uma região tardia ou “Late”. Na região Early são codificados os genes precoces da infecção, E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Na região Late são codificados os genes pertencentes ao capsídeo viral, L1 e L2.....4

FIGURA 2. Principais etapas no desenvolvimento do carcinoma cervical. Relação dos achados citopatológicos com a colposcopia nas mesmas etapas de progressão, estando cada etapa associada a um tipo de infecção (adaptada da revisão de Schiffman *et al.*, 20076

FIGURA 3. A progressão da infecção do HPV para lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial de alto grau (HSIL), carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo depende de alterações celulares causadas por danos no controle do ciclo celular, sobre ação dos oncogenes E6 e E7 sobre dois supressores, p53 e pRB, respectivamente (adaptada de zur Hausen, 2002).....9

FIGURA 4. Questionário realizado para cada paciente anteriormente a coleta. A anamnese cuidadosa seleciona as pacientes com principais fatores de risco, como atividade sexual, múltiplos parceiros sexuais, não realização frequente de exame preventivo, entre outros, servindo posteriormente para dados epidemiológicos e estatísticos.....17

FIGURA 5. Ilustração das alterações morfológicas encontradas nas amostras das 630 pacientes, baseadas no Sistema Bethesda, 1998, coradas por Papanicolaou e analisadas por microscopia óptica. LSIL = lesão intraepitelial de baixo grau. HSIL = lesão intraepitelial de alto grau. Aumento 400x. Setas: **1 e 2.** Célula normal sem alterações morfológicas. **3.** células com reações inflamatórias e presença de polimorfonucleares. **4.** alteração nuclear atípica. **5.** células superficiais com núcleo alterado. **6.** células da camada basal com núcleo alterado. **7.** células glandulares

(endocervicais) alteradas com presença de hemorragia. 8. célula escamosa alterada com presença de diátese tumoral.....26

FIGURA 6. Padronização de imunocitoquímica para MMP-9. Campos alternativos da reação em esfregaços cérvico-vaginais. As amostras de placenta foram utilizadas como controle positivo da reação, mostrando a marcação positiva. CN = controle negativo sem anticorpo primário, não apresentando marcação. Aumento 400x.....30

FIGURA 7. Padronização de imunocitoquímica para MMP-9. Campos alternativos da reação em esfregaços cérvico-vaginais. Uma cruz (+) apresentando fraca marcação da proteína, duas cruzes (++) apresentando moderada marcação e três cruzes (+++) apresentando intensa marcação, tanto em células escamosas como em polimorfonucleares. CN: controle negativo sem anticorpo primário. Aumento 1000x.....30

FIGURA 8. Representação ilustrativa do gráfico 3, das imunocitoquímicas das 45 lâminas normais com marcação ausente em 20% das células escamosas, intensidade fraca em 71% das amostras e intensidade de moderada de marcação em 9% das lâminas. Aumento 400x.....31

FIGURA 9. Representação ilustrativa do gráfico 3 das imunocitoquímicas das 311 lâminas inflamatórias inespecíficas com marcação fraca ausente em 10% das lâminas, fraca em 78%, moderada em 11% e intensa em 2% das amostras. Aumento 400x.....32

FIGURA 10. Representação ilustrativa do gráfico 3 das imunocitoquímicas das 176 lâminas inflamatórias específicas, com marcação ausente em 10%, intensidade fraca em 78%, moderada em 10% e acentuada em 2% das amostras. Aumento 400x.....33

FIGURA 11. Representação ilustrativa do gráfico 3, nas duas primeiras colunas, das imunocitoquímicas das 50 lâminas LSIL com expressão fraca em 76% e moderada em 24% das amostras. Nas duas colunas da direita, a figura representa também as

16 amostras de LSIL associadas a agentes infecciosos com expressão fraca em 62,5% das amostras, moderada em 31,5% e acentuada em 6% das amostras. Aumento 400x.....**34**

FIGURA 12. Representação ilustrativa do gráfico 3, das lesões de alto grau. imunocitoquímicas das 10 lâminas de HSIL com expressão moderada em 100% e expressão fraca em 100% da amostra associada a vaginose bacteriana. Aumento 400x.....**35**

FIGURA 13. Representação ilustrativa do gráfico 1, das imunocitoquímicas das 4 amostras tumorais, apresentando 100% de marcação intensa nos carcinomas escamosos invasivos, e 50% de marcação moderada e 50% de marcação acentuada nos adenocarcinomas. Aumento 400x.....**36**

LISTA DE TABELAS

Página

TABELA 1 - Tipos de HPVs indicando a rara prevalência de outros tipos virais nas lesões e tumores cervicais, que embora possua maior prevalência do tipo 16, pode estar associada a outros tipos menos frequentes de HPVs (zur Hausen,2002)...**7**

TABELA 2 - Dados estatísticos obtidos através das anamneses das pacientes coletadas, mostrando a distribuição de fatores de risco nos diferentes laudos citopatológicos. Inflam = inflamatório, LSIL = lesão de baixo grau, HSIL = lesão de alto grau.....**22**

LISTA DE GRÁFICOS

Página

- GRÁFICO 1** - Laudo citopatológico das amostras cérvico-vaginais das 630 pacientes. Os esfregaços citológicos foram analisados pelo laboratório IN CITO. O gráfico representa o total de amostras, que foram divididas entre a presença e a ausência de agentes inflamatórios. LSIL = lesão intraepitelial de baixo grau. HSIL = lesão intraepitelial de alto grau.....**28**
- GRÁFICO 2** - Prevalência de agentes infecciosos nas 630 amostras cérvico-vaginais. Os laudos apresentando inflamação específica, foram divididos entre aos agentes infecciosos onde a maior prevalência de infecção se dá por vaginose bacteriana, seguida por *Trichomonas vaginalis*.....**28**
- GRÁFICO 3** - Dados da progressão da intensidade de MMP-9 nas amostras cérvico-vaginais de 621 pacientes. Observa-se um aumento da expressão da proteína correlacionando-se com a progressão e gravidade das lesões. Observa-se ainda, que em lâminas LSIL associadas a algum agente infeccioso, há um aumento da expressão da proteína, quando comparadas com as lâminas LSIL sem algum agente infeccioso. No entanto, pode-se observar o contrário nas lâminas HSIL, quando na presença do agente há uma menor expressão da proteína. Duas lâminas, uma inflamatória inespecífica e outra inflamatória específica, não apresentaram células para serem analisadas. LSIL = lesão intraepitelial de baixo grau. HSIL = lesão intraepitelial de alto grau. ASC-US = atipia celular escamosa de significado indeterminado.....**37**
- GRÁFICO 4** - Dados da progressão da intensidade de MMP-9 em células de polimorfonucleares, nas amostras cérvico-vaginais de 621 pacientes. Observa-se um aumento da expressão da proteína correlacionando-se com a progressão e gravidade das lesões. LSIL = lesão intraepitelial de baixo grau. HSIL = lesão intraepitelial de alto grau. ASC-US = atipia celular escamosa de significado indeterminado....**39**
- GRÁFICO 5** - Dados da progressão da intensidade de MMP-9 correlacionando células escamosas com polimorfonucleares, nas 621 pacientes. Observa-se um aumento da expressão da proteína em seguimento a a progressão e gravidade das lesões. LSIL = lesão intraepitelial de baixo grau. HSIL = lesão intraepitelial de alto grau. ASC-US = atipia celular escamosa de significado indeterminado.....**40**

LISTA DE ABREVIATURAS

AGC - células glandulares atípicas de significado indeterminado

AIDS - síndrome da imunodeficiência adquirida

ASC-US - células escamosas atípicas de significado indeterminado

BSA - albumina sérica bovina

DNA - ácido desoxirribonucleico

D.U.M - data da última menstruação

E2 - proteína viral precoce 2

E4 - proteína viral precoce 4

E5 - proteína viral precoce 5

E6 - proteína viral precoce 6

E7 - proteína viral precoce 7

EGF - fator de crescimento epidérmico

FGF - fator de crescimento

HPV - Papilomavírus humano

HSIL - lesão intra-epitelial escamosa de alto grau

JEC - junção escamo-colunar

L 1 - proteína estrutural 1

L 2 - proteína estrutural 2

LCR - região não codificadora de controle longo

LSIL - lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau

MEC - matriz extracelular

MMP - metaloproteinase de matriz

MT1-MMP - metaloproteinase de matriz aderida à membrana do tipo 1

NIC - neoplasia intra-epitelial cervical

OPSCC - carcinoma escamoso de orofaringe

PBSA - tampão sódio-fosfato livre de cálcio e magnésio

RNA_m - ácido ribonucleico mensageiro

SCC - carcinoma de células escamosas

TIMP - inibidor tecidual de metaloproteinase

TNF- α - fator de necrose tumoral

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	O Carcinoma cervical e o HPV.....	1
1.2	O valor da Citopatologia e o rastreamento de lesões pré-neoplásicas	9
1.3	O papel das metaloproteinases de matriz na tumorigênese	11
1.4	Populações encarcerada.....	14
2	OBJETIVO GERAL	15
2.1	Objetivos específicos:	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1	Amostras.....	15
3.2	Anamnese.....	16
3.3	Citologia convencional.....	18
3.4	Imunocitoquímica.....	18
4	RESULTADOS	20
4.1	Material coletado	20
4.2	Anamnese.....	20
4.2.1	Perfil das 630 pacientes	20
4.2.2	Perfil das pacientes com laudo citológico sem lesão ou inflamação	23
4.2.3	Perfil das pacientes com processo inflamatório inespecífico e específico.....	23
4.2.4	Perfil das pacientes com algum grau de lesão.....	23
4.3	Definição de laudo citopatológico	24
4.4	Laudo citopatológico emitido pelo Laboratório IN CITO.....	27
4.5	Imunocitoquímica.....	29
4.5.1	Padronização do método.....	29
4.5.2	Imunocitoquímica nas amostras das pacientes.....	31
5	DISCUSSÃO.....	41
6	CONCLUSÃO	46
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
	ANEXO A.....	57
	ANEXO B.....	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Carcinoma cervical e o HPV

O carcinoma cervical é hoje responsável por quase 12% de todos os carcinomas na população feminina. Representa o segundo tipo tumoral mais incidente em mulheres de 20 a 39 anos de idade. Anualmente a taxa mundial alcança 500 mil novos casos de câncer cervical, ficando atrás somente do câncer de mama (Snijders *et al.*, 2006; INCA, 2010).

Se detectado precocemente, o carcinoma cervical invasivo é um tumor evitável e curável por se desenvolver de maneira insidiosa e previsível, levando aproximadamente 5 anos entre a infecção viral e os primeiros sinais de lesões pré-cancerosas, e até 20 anos para o seu estabelecimento (revisado por Schiffman *et al.*; 2007).

Os fatores de risco que podem auxiliar o desenvolvimento de tumores na cérvix uterina são sistema imunológico deficiente, tabagismo, múltiplos parceiros sexuais, atividade sexual precoce, baixas condições sócio-econômicas, efeitos hormonais dos anticoncepcionais orais e infecção por outros microorganismos, além da ausência rastreamento frequente de exame citológico de Papanicolau (Rabelo-Santos, 2003; Villa *et al.*, 2009; zur Hausen; 2009). Porém, é a infecção pelo vírus HPV que se classifica como principal fator de risco, associada a 99,7% dos casos de carcinomas invasivos (Walboomers *et al.*, 1999; Moody & Laimins, 2010).

O Papilomavírus humano (HPV), é um membro da família *Papillomaviridae*, um grupo de vírus heterogêneo que se caracterizam como epiteliotrópicos devido ao seu intenso tropismo por mucosas e pele (Kucknoor *et al.*, 2005; Imtiaz *et al.*, 2007).

Sua transmissão ocorre através do contato entre pele-pele e mucosa-mucosa sendo prevalente nas populações sexualmente ativas pelo fato do comportamento sexual e faixa etária serem os principais fatores de riscos para a transmissão e infecção do HPV (Gerber *et al.*, 2001; Ault, 2006; Bosch and Muñoz, 2008; zur Hausen, 2009).

O ciclo produtivo de vida do HPV está diretamente relacionado a diferenciação epitelial, e é capaz de induzir alterações no ciclo da célula epitelial hospedeira, podendo gerar um acúmulo de mutações e induzir o desenvolvimento de neoplasias, se estabelecendo como o agente etiológico do carcinoma cervical. (Bosch & Muñoz, 2002; Hebner & Laimins, 2006; Burk *et al.*, 2009; Jemal, 2009).

Na década de 70, após anos de estudos entre a relação das verrugas genitais e cutâneas com o HPV, alguns trabalhos experimentais apontavam um possível papel do vírus em cânceres, iniciando discussões sobre a pluralidade dos tipos de HPVs. Os diferentes tipos de vírus poderiam ser a explicação pelas diferenças antigênicas observadas entre verrugas genitais causadas por HPV (zur Hausen, 2009).

Atualmente é possível a detecção e tipagem de mais de 120 tipos de HPVs que diferem entre si, onde aproximadamente 40 tipos infectam especificamente o epitélio ano-genital (Tabela 1). Alguns tipos de HPVs, entre eles os tipos; 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81 são considerados de baixo risco pelo seu baixo potencial oncogênico, causando lesões de baixo grau e verrugas genitais em áreas da vagina, cérvix, vulva, pênis e reto. Outros tipos virais são considerados de alto risco pelo seu alto potencial oncogênico em desenvolver lesões, como os tipos; 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 (de Villiers & zur Hausen, 1981; zur Hausen, 2002; Muñoz *et al.*, 2003; Moody & Laimins, 2010).

A detecção viral e sua tipagem são possíveis através de técnicas como hibridização *in situ*, captura Híbrida, reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizadas em centros de pesquisas e raramente na clínica devido ao seu alto custo. Estas técnicas podem ser combinadas ao rastreamento citopatológico convencional e a histologia a fim de reduzir os diagnósticos falso-positivos e falso-negativos (Muñoz *et al.*, 2003; Campisi *et al.*, 2007; Bosch *et al.*, 2008).

Segundo a literatura, além da transmissão do HPV, o tipo viral é um outro fator determinante conhecido para a persistência de lesões e para a progressão do câncer, sendo principalmente o 16 o mais incidente em carcinomas invasivos. Uma infecção persistente por um HPV de alto risco aumenta a probabilidade de desenvolvimento de neoplasias, descoberta esta que premiou o pesquisador alemão Harald zur Hausen com o Prêmio Nobel de Medicina em 2008.

Entretanto, independente do tipo viral, o HPV pode infectar células do epitélio de revestimento do colo uterino, como as do epitélio escamoso e também glandular

na região da junção escamo-colunar (JEC). Nesta região anatômica, localiza-se a região da zona de transformação, onde se iniciam as primeiras alterações de desenvolvimento tumoral de células escamosas, além de também se apresentarem as células glandulares, que se infectadas pelo HPV, podem levar ao adenocarcinoma. Os tumores do trato genital se iniciam, através de microlesões nessa região, sendo primariamente uma infecção viral transiente (Walboomers *et al.*, 1999; Moody & Laimins, 2010). Cerca de 80% dos casos desenvolvem um tipo de resposta imune específica, debelando a infecção espontaneamente, e 20% dos casos evoluem para uma lesão intraepitelial de baixo grau. (Castle *et al.*, 2005; Cohen *et al.*, 2005; Schiffman, 2005; Clifford *et al.*, 2006; Snijders *et al.*, 2006; Visconti, 2009).

Estruturalmente, como mostrado na Figura 1, o HPV é uma partícula de 50 nm não envelopada e possui um DNA circular dupla fita, contendo um genoma de aproximadamente 8.000 pares de nucleotídeos que codifica 8 genes (Figura 1). Apresentam-se seis genes da região *Early* ou “precocce”, responsáveis pelos processos iniciais da replicação viral, controle de sua transcrição e transformação celular, como E1, E2, E4, E5, E6 e E7 posicionados nas janelas de leitura chamadas de ORF (open reading frame). Outros dois genes encontram-se na região *Late* ou “tardia”, responsáveis pelas etapas finais da replicação do vírus, que codificam as proteínas L1 e L2 do capsídeo viral (Gerber *et al.*, 2001). O genoma viral do HPV possui ainda uma região não codificadora chamada de LCR (long control region) que controla os demais genes (Schiffman *et al.*, 2007; Burk *et al.*; 2009).

Figura 1. Organização genômica do HPV contendo uma região não codificadora (LCR), uma região precoce ou “Early” e uma região tardia ou “Late”. Na região Early são codificados os genes precoces da infecção, E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Na região Late são codificados os genes pertencentes ao capsídeo viral, L1 e L2.

O papel das proteínas E1 e E4 no processo de transformação maligna está relacionado às etapas de replicação durante a infecção episomal e modificações no citoesqueleto celular. Essas modificações facilitam a liberação das partículas virais, sendo E1 uma importante proteína no processo de iniciação e alongamento do DNA viral, além de estar diretamente ligada ao processo de formação do plasmídeo (zur Hausen, 2002; Doorbar *et al.*, 2006; Schiffman *et al.*, 2007).

A infecção pelo HPV se caracteriza como episomal; quando o vírus ainda não se integrou no genoma da célula hospedeira, ou integrada; quando o vírus se integra

ao genoma da célula hospedeira. Esta última pode ser classificada como transiente (Figura 2); quando o próprio sistema imunológico da paciente combate o vírus, variando de meses até anos, ou do tipo persistente (Figura 2); onde 5 a 10% dos casos podem desenvolver câncer. Quando a infecção viral é persistente, pode ocorrer a integração do genoma viral através de sua linearização, e posterior inserção na célula epitelial hospedeira. No entanto, é possível que essa integração ocorra anteriormente a persistência da infecção. Porém, antes de ocorrer a linearização e integração, o genoma do HPV encontra-se episomal onde o DNA viral se mantém na forma de plasmídeo de multicópia estável, sendo possível encontrar de 50 a 100 cópias de DNA episomal em cada célula (zur Hausen, 2002; Schiffman *et al.*, 2007; Moody & Laimins, 2010).

Em se tratando da replicação, é importante ressaltar que o DNA viral necessita do auxílio da proteína E2, que durante a infecção episomal, auxilia na pré-iniciação do complexo E1:E2, importantes por reprimirem a expressão gênica, atuando no controle do ciclo celular. Por sua vez, algumas alterações e mutações podem levar ao descontrole desse ciclo, e podem ser iniciadas com o rompimento do DNA viral, que ocorre na região do gene E2. Com o rompimento, o DNA viral se lineariza, o que pode levar a integração do DNA viral na célula epitelial hospedeira. Após a linearização, E2 perde o poder regulador que exercia sobre o promotor que regula E6 e E7, que passam a ser expressos constitutiva e exarcebadamente, atuando na linha de frente da infecção (Narisawa *et al.*, 2007; Schiffman *et al.*, 2007; Moody & Laimins, 2010).

Como nem todo indivíduo infectado pelo HPV desenvolve câncer, são essenciais para a progressão maligna algumas alterações celulares e rearranjos cromossomais, levando às instabilidades genômicas (Cohen *et al.*, 2005; Visconti, 2009; Moody & Laimins, 2010).

Quando passam a ser expressos de forma descontrolada, E6 e E7 podem levar ao início de uma lesão, pois possuem papel na inibição dos mecanismos de apoptose e controle do ciclo celular. As oncoproteínas E6 e E7 atuam como fatores críticos na carcinogênese por manipularem alguns reguladores do ciclo celular. Inativam supressores tumorais como as proteínas p53 e pRb, respectivamente, comumente mutadas em outros tumores humanos, induzindo à uma instabilidade cromossômica e imortalização, esta última causada apenas por HPVs de alto risco. (Ishiji *et al.*, 2000; Snijders *et al.*, 2006; Moody & Laimins, 2010). A oncoproteína E6

do HPV promove a degradação da proteína supressora de tumor p53 através da sua interação com E6AP, uma proteína E3 ubiquitina ligase, enquanto a oncoproteína E7 liga-se e degrada pRB, proteína do retinoblastoma, alterando sua formação através de fosforilação, resultando na liberação e ativação de fatores de transcrição E2F (Narisawa *et al.*, 2007; Snijders *et al.*, 2006; Schiffman *et al.*, 2007; Moody & Laimins, 2010).

Além das proteínas de alto risco E6 e E7, a oncoproteína E5 colabora na proliferação de células infectadas, facilitando a progressão maligna. A ação combinada destas proteínas, no direcionamento da regulação do ciclo celular, resulta também na anulação de pontos de controle do ciclo celular, quando persistentemente infectadas pelo HPV, podendo levar ao acúmulo de mutações celulares ao longo do tempo e a consequente progressão de lesões (Narisawa *et al.*, 2007; Schiffman *et al.*, 2007).

Figura 2. Principais etapas no desenvolvimento do carcinoma cervical. Relação dos achados citopatológicos com a colposcopia nas mesmas etapas de progressão, estando cada etapa associada a um tipo de infecção (adaptada da revisão de Schiffman *et al.*, 2007).

Tabela 1 – Tipos de HPVs indicando a rara prevalência de outros tipos virais nas lesões e tumores cervicais, que embora possua maior prevalência do tipo 16, pode estar associada a outros tipos menos freqüentes de HPVs (zur Hausen, 2002).

Tipo de lesão genital	Tipos de HPVs	
	Menos prevalente	Mais prevalente
Condiloma acuminado	42,44,51,53,8	6,11
Lesão intraepitelial	6,11,18,26,30,31,33,34,35,39,40,42,43,45,51,52,53,54,55,56,57,58,59,61,62,64,66,67,68,69,70,71,73,74,79,81,82,83,84	16
Carcinoma cervical e outros carcinomas anogenitais	(6,11),18,31,33,35,39,45,51,52,54,56,58,59,66,68,69	16

Como observado na Figura 3, o estabelecimento do carcinoma cervical pode ocorrer a partir das lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) e a etapas associadas a integração e persistência, como as lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL ou carcinoma *in situ*) (Cremerj *et al.*, 2007, zur Hausen, 2002; Schiffman *et al.*, 2007).

Cerca de 1% da população desenvolve verrugas genitais e 4% das mulheres possuem lesões precursoras como a lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) ou de alto grau (HSIL), segundo a nova classificação de Bethesda em 1998, revisada em 2001 e 2006 (Joste, 2008).

A estimativa mostra que apenas 15% das LSIL que apresentam o HPV-16 evoluem para HSIL (Castle *et al.*, 2005). Entretanto, as HSIL representam cerca de 90% dos casos que desenvolvem um carcinoma invasivo, porém nem toda lesão de baixo e alto grau progridem para um processo tumoral (Walboomers, 1999; INCA, 2010).

O diagnóstico de lesões pré-cancerosas, incluindo LSIL e HSIL, em 40% dos casos leva de 3-5 anos, sendo que a faixa etária de risco para infecções pelo HPV e desenvolvimento de lesões, varia entre 25 a 35 anos de idade. Devido à progressão

lenta deste carcinoma o pico para o diagnóstico tumoral encontra-se entre 35 e 55 anos (zur Hausen, 2002, Schiffman *et al.*, 2007).

Como citado, o sistema imune deficiente é um importante fator na infecção viral persistente e por este motivo relata-se uma maior incidência de lesões em mulheres imunossuprimidas (zur Hausen, 2002). Neste sentido, o trabalho de Clifford *et al.*, 2006, utilizando meta-análise, revelou que a proporção de mulheres HIV-positivas com o HPV do tipo 16 aumentou conforme as lesões progrediam e agravavam-se. Porém, as mulheres HIV-positivas infectadas com HSIL apresentaram maior probabilidade de infecção por outros tipos de HPV, ou infecção múltipla quando comparando com a população feminina com HSIL em geral.

Em geral, a maioria das mulheres sexualmente ativas irão se infectar por um ou mais tipos de HPVs, podendo desenvolver anticorpos para combater o vírus. Entretanto a progressão para uma HSIL, carcinoma escamoso invasivo ou adenocarcinoma invasivo ocorre em uma pequena porcentagem dos casos, menos de 1%, que podem não ser competentes o suficiente para combater o vírus (zur Hausen, 2002; Parkin *et al.*, 2005; Snijders *et al.*, 2006; revisado por Schiffman *et al.*, 2007).

Embora a minoria dos casos desenvolva tumor é importante ressaltar a alta taxa de mortalidade, que acomete aproximadamente 50% dos casos em países em desenvolvimento, fazendo deste carcinoma um sério problema de saúde pública no Brasil e no mundo (OMS, 1990; Parink *et al.*, 2005; INCA, 2010).

Portanto, para que a taxa de sobrevida aumente, é necessário intensificar as buscas não só por novas medidas preventivas ou terapêuticas como também métodos de diagnóstico e prognóstico, a fim de erradicar os altos índices de óbitos pelo carcinoma cervical.

Figura 3. A progressão da infecção do HPV para lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial de alto grau (HSIL), carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo depende de alterações celulares causadas por danos no controle do ciclo celular, sobre ação dos oncogenes E6 e E7 sobre dois supressores, p53 e pRB, respectivamente (adaptada de zur Hausen, 2002).

1.2 O valor da Citopatologia e o rastreamento de lesões pré-neoplásicas

A prevenção do carcinoma cervical tanto em países em desenvolvimento como nas populações mais desenvolvidas, se faz pelo rastreamento de lesões no colo do útero por meio da citopatologia, que é o exame preventivo convencional conhecido como “Papanicolaou”, descrito pelo médico grego George Nicholas Papanicolaou, em 1928 (Papanicolaou, 1942; Papanicolaou, 1948).

A popularidade e o sucesso do exame preventivo se dão por este ser um método rápido, indolor, pouco invasivo e de baixo custo, mas principalmente por rastrear as lesões da cérvix uterina, e tem reduzido drasticamente a incidência de mortes pelo carcinoma cervical, desde que realizado periodicamente. A citologia cérvico-vaginal permite não apenas o rastreamento de lesões cervicais, como

também a detecção de infecções por agentes patogênicos e distúrbios hormonais (Franco *et al.*, 2008).

Porém, embora a citologia sinalize a presença de lesões e tumor, é necessária a confirmação do laudo fornecido pela histopatologia, considerada como “padrão ouro” no diagnóstico final. Uma redução significativa nos casos de carcinoma cervical e morte têm sido observadas, desde a década de 60, em países com adequado rastreamento citológicos, envolvendo a cobertura dos programas de prevenção, a qualidade dos serviços prestados na citopatologia e o tratamento fornecido (Zeferino e Derchain, 2006; Rama *et al.*, 2008).

O Ministério da Saúde no Brasil preconiza através do Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama - Viva Mulher, que seja realizado um exame preventivo anual entre mulheres de 25-60 anos ou a partir do primeiro contato sexual. Se 3 exames negativos consecutivos forem apresentados, preconiza-se que novos exames sejam realizados a cada 3 anos (Bundrick, 2005; Amaral *et al.*, 2008).

O método citológico embora seja eficaz e apresente alta especificidade, apresenta falhas, como baixa sensibilidade, gerando 68%, de resultados falso-negativos além da baixa reprodutibilidade, como também um baixo valor preditivo positivo em determinar o risco de desenvolvimento de tumor. A citologia, embora seja o método de escolha para rastreamento de lesões, é discutida por ser uma técnica imprecisa, com variações, como erros de coleta responsáveis por 20-39% dos falso-negativos, variações na conduta da técnica como diferenças de interpretação das amostras (Pias e Vargas, 2009).

O Papanicolaou é atualmente o método mais eficaz mundialmente em prevenção do carcinoma do colo uterino, que reduziu, só nos Estados Unidos, 80% a incidência de carcinoma cervical (Monsonégo *et al.*, 2006; Bauch *et al.*, 2010; Chow *et al.*, 2010).

Embora a citologia oncológica tenha auxiliado na redução da incidência deste tumor, os índices de morbidade e mortalidade ainda são altos, o que talvez seja resultado da baixa cobertura do exame de Papanicolaou, principalmente em países ainda em desenvolvimento, onde a desigualdade sócio-econômica continua prevalente, revelando a importância da continuidade de buscas por métodos alternativos de prognóstico e diagnóstico, que em muito podem contribuir para o aumento da sobrevivência (Rama *et al.*, 2008).

Portanto, para o avanço da eficácia dos métodos preventivos será necessário, no futuro, o desenvolvimento de vacinas polivalentes, que proporcionem proteção ou terapia a um maior número de tipos de HPV carcinogênicos. Portanto, o incentivo a programas de prevenção, redução do custo das vacinas disponíveis (bi e tetravalente, Cervarix e Gardasil, respectivamente) e otimização dos programas de acompanhamento pós-vacinal representarão o sucesso para diminuição de novos casos de câncer cervical (Monsonégo, 2006; Gardland *et al.*, 2009).

1.3 O papel das metaloproteinases de matriz na tumorigênese

A interação controlada das células com a matriz extracelular é essencial para o funcionamento adequado do organismo. Desta forma, a transformação de uma neoplasia não invasiva em um carcinoma invasivo de cérvix uterina está acompanhada inicialmente por uma interrupção tecidual, seguida pela degradação da membrana basal e migração de células na matriz extracelular subjacente, pela ação de proteases. Níveis alterados e desequilíbrio na distribuição dessas proteases representam um aumento no potencial invasivo (Brummer *et al.*, 2002). Durante o processo de progressão maligna, essas alterações são características fundamentais da invasão tumoral (Chakraborti, 2003; Noda *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2008).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são proteases que pertencem a uma família de endopeptidases zinco-dependentes, que regulam e clivam quase todas as proteínas constituintes da matriz extracelular. São secretadas por macrófagos, neutrófilos, linfócitos, queratinócitos, e podem ser ativadas por sistemas que incluem plasminogênio, furina e a quebra da ligação de zinco. Possuem 3 domínios; um pró-peptídeo, um pró-peptídeo que mantém a latência da proteína até que seja clivada, e um domínio catalítico, onde reside a região conservada da ligação com zinco (de Souza *et al.*, 1999; Sheu *et al.*, 2003, Libra *et al.*, 2009; Hadler-Olsen *et al.*, 2010).

Já foram descritos 24 tipos de MMPs, que diferem entre si na especificidade ao substrato, sendo divididas em: collagenases (MMP-1, -8 e -13) que degradam colágeno do tipo I, II e III; gelatinases (MMP-2 e -9) que degradam preferencialmente colágeno tipo IV, fibronectina e elastina; estromelisinases (MMP-3, -10 e -11) e matrilisinas (MMP-7 e -26) que degradam moléculas de proteoglicanos, laminina e fibronectina; e metaloproteinases de membrana (MT1-MMP a MT7-MMP) sendo a

MT6-MMP a nova MMP-25 (leucolisina). Outras 3 diferentes MMPs, a MMP-26 (matrixina), a MMP-27, e ainda a MMP-28, totalizando 28 MMPs que são atualmente descritas na literatura (Pei *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2000; Marchenko *et al.*, 2001; Chakraborti *et al.*, 2003; Kanwar *et al.*, 2004; No *et al.*, 2009; Hadler-Olsen; 2010).

As MMPs participam tanto de processos fisiológicos como remodelamento tecidual, desenvolvimento embrionário, ovulação, angiogênese e cicatrização; como em processos patológicos, como artrite, inflamação e câncer (Libra *et al.*, 2009).

Estudos de invasão tumoral e metástases em diversos tumores, têm se concentrado na degradação da matriz extracelular e membrana basal das células endoteliais. As MMP-2 e MMP-9 estão relacionadas com os processos de invasão e metástase de células tumorais. Estão envolvidos na invasão tumoral, o controle da transcrição dos genes que codificam as MMPs, controle da sua ativação e da produção dos seus inibidores teciduais TIMP-1 e TIMP-2, produzidos pela maioria das células mesenquimais (Benaud *et al.*, 1998; Singer *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002).

Muitos estudos em carcinomas cervicais descrevem a degradação da matriz extracelular (MEC), com ação das MMPs-2 e -9, no processo de invasão, metástase e recorrência de tumores (Brummer *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002; Sheu *et al.*, 2003).

A expressão de MMP-9, foco deste estudo, é regulada por citocinas e fatores de crescimento, como interleucinas, interferons, TNF- α (fator de necrose tumoral) e fatores de crescimento como EGF (fator de crescimento endotelial), VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e FGF (fator de crescimento) (Chakraborti *et al.*, 2003; Sheu *et al.*, 2003; Libra *et al.*, 2009; No *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2009).

Segundo da Silva Cardeal *et al.*, 2006, a presença do HPV-16 está relacionada a um aumento da expressão de MMP-2, MMP-9, MT1-MMP e TIMP-2, bem como a um aumento da atividade de pró-MMP-2, em linhagens celulares de neoplasias cervicais C33A, CaSki e SiHa. Dado este que sugere que o HPV poderia desempenhar um papel na regulação da expressão de MMPs e TIMP-2.

Na mesma linha de pesquisa, Fernandes *et al.*, 2002, em um estudo de imunohistoquímica, avaliaram a expressão de MMP-2 em neoplasia intraepitelial cervical III (NIC3) e em carcinoma espinocelular do colo uterino, tanto em células tumorais como em células do estroma adjacente. A expressão da MMP-2 se mostrou aumentada nas células estromais do carcinoma do que na neoplasia de grau III,

sugerindo que há uma importante ação do estroma na invasão e na progressão tumoral.

Em estudo semelhante ao citado acima, Brummer *et al.*, 2002, descreveram a expressão de MMP-2 em lesões pré-invasivas de cérvix uterina e uma consecutiva co-expressão de MMP-1 e MMP-2 em lesões intraepiteliais de alto grau e tumores cervicais. Tais dados sugerem um gradual aumento no potencial invasivo.

Em relação às MMP-s na progressão tumoral, No *et al.*, 2009, sugeriram, através de um estudo por imunohistoquímica em 39 amostras de tecidos de pacientes com diferentes graus de NIC (neoplasia intra-epitelial cervical), que a MMP-9 pode desempenhar um papel importante na progressão de lesões. Da mesma forma que Sheu *et al.*, 2003, após estudo de imunohistoquímica e Zimografia em 8 amostras de LSIL, 23 amostras de HSIL e 31 amostras de carcinoma, demonstraram que as MMPs tem um possível valor prognóstico no carcinoma uterino. Conclui-se que se estas correlações refletem um papel causal para MMP-2, a sua inibição pode fornecer valor terapêutico.

Recentemente, uma lista de substratos para a MT1-MMP tem sido relatada, que inclui plasminogênio, quimiocinas e citocinas, desempenhando um papel importante na progressão tumoral (Smola-Hess *et al.*, 2005). O plasminogênio induz proteólise seletiva do IGF (fator de crescimento semelhante à insulina), podendo promover a proliferação dos queratinócitos, um pré-requisito para a replicação do HPV. Os resultados demonstraram, em resumo, que as proteínas E6 e E7 do HPV tipo 16 de alto risco e tipo 8 levam à indução de MT1-MMP, possivelmente explicando a alta expressão de MMP-14 (Smola-Hess *et al.*, 2005).

No seguimento de pesquisas anteriores como as citadas acima, recentes estudos também têm sugerido que as MMPs reconhecem substratos da matriz extracelular envolvidos não só na regulação celular e na reparação tecidual, como também na inflamação. Por este motivo tem sido sugerida uma possível relação das MMPs com inflamações crônicas, em resposta a infecção por agentes como HPV, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* *Gardnerella vaginalis*, sendo necessários estudos complementares para desvendar o possível papel das MMPs também nas inflamações (Kucknoor *et al.*, 2005; Pal *et al.*, 2005; Imtiaz *et al.*, 2007).

Referente a inflamação, Boccardo *et al.*, 2010, relataram que embora o HPV não cause dano em tecidos e lise celular como outras infecções, a inflamação tem um importante papel na carcinogênese, podendo auxiliar na promoção da

persistência viral e progressão de lesões como também em prevenir infecções precoces, utilizando mecanismos que podem direcionar o tumor.

Portanto, as MMPs podem estar relacionadas ao HPV e outros agentes, por estarem ambos diretamente ligados a processos de inflamação e lesões. Vários estudos histológicos atestam o aumento da atividade de MMPs de acordo com o grau de lesões e de câncer cervical (Libra *et al.*, 2002; Sheu *et al.*, 2003; No *et al.*, 2009). A MMP-9 foi escolhida para este estudo por ser a MMP mais relacionada com carcinomas cervicais, além de fazer parte da linha de pesquisa do laboratório. Considerando este fato, propomos aqui avaliar a MMP-9, através de imunocitoquímica, em esfregaços cérvico-vaginais, a fim de investigarmos a possível utilização desta técnica como um marcador de valor preditivo de melhor prognóstico em pacientes com lesões e tumor, com a vantagem de representar um método pouco invasivo frente a biópsia.

1.4 Populações encarcerada

A situação da mulher presa no Brasil relacionada às dificuldades enfrentadas, como difícil acesso a diagnósticos, acompanhamento e tratamentos, são o ponto de partida para estudos em pesquisa envolvendo prevalência do desenvolvimento de diferentes tipos de carcinomas.

Segundo dados do INFOPEN 2010 pertencente ao Sistema Judicial do Ministério da Justiça, até dezembro de 2009 encontravam-se em detenção aproximadamente 31.400 mulheres, ficando o estado de São Paulo com o maior número de presas.

Segundo Mathew *et al.*, 2005, as infecções associadas a um maior risco de desenvolver câncer, são mais prevalentes em prisioneiros do que na população geral externa, podendo ser um fator impactante na estatística do câncer.

Este estudo propiciará não somente uma melhor compreensão da prevalência do HPV em uma população reclusa e sua relação com MMP-9, como também o fornecimento do diagnóstico citológico, dando oportunidade de tratamento para as pacientes.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo consistiu em avaliar a MMP-9, através de imunocitoquímica, em esfregaços cérvico-vaginais coletados na Penitenciária Feminina de Sant'ana, a fim de investigarmos a possível utilização desta técnica como um marcador de valor preditivo de melhor prognóstico em pacientes com lesões e tumor, com a vantagem de representar um método pouco invasivo frente a biópsia;

2.1 Objetivos específicos:

- 1º. Realização da coleta de Papanicolaou e posteriormente o diagnóstico citológico, no período de agosto de 2009 a agosto de 2010.
- 2º. Avaliação dos níveis de expressão da MMP-9 através de imunocitoquímica nos esfregaços.
- 3º. Avaliação do esfregaço cérvico-vaginal quanto a presença de processo inflamatório, agentes inflamatórios como também o grau da lesão e comparação com a expressão da MMP-9.
- 4º. Análise das anamneses das respectivas amostras avaliando e contrapondo os fatores de risco já estabelecidos pela literatura.
- 5º. Realização da análise estatística dos dados com base no n de 630 amostras, resultadas pelo comparecimento das pacientes para coleta

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

A Penitenciária Feminina de Ana conta com a reclusão de 2.720 detentas, que foram elegíveis por voluntariado, para coleta pelo comparecimento no período de Agosto de 2009 a Agosto de 2010, com faixa etária entre 18 e 70 anos, sendo o processo de seleção baseado na sequência de celas e pavilhões através do sistema

de cadastro. O problema do carcinoma cervical na saúde pública foi introduzido de maneira esclarecedora, ficando a paciente com o direito de ausentar-se da coleta.

A inclusão das amostras no presente estudo foi consentida pela Diretoria da Penitenciária além da autorização dos comitês de ética da Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP (Projeto Nº.0369/06) com ciência do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF-USP (Ofício CEP 107/2010).

Foram excluídas apenas as pacientes que se reservaram no direito de não participarem do exame preventivo.

Os laudos emitidos das amostras que apresentaram lesão ou infecção foram encaminhadas para a Penitenciária Feminina de Sant'ana pelo Dr. Marco Antonio Zonta, responsável pelo Laboratório IN CITO CITOLOGIA DIAGNÓSTICA, para a coordenação da penitenciária para posterior tratamento cedido pela própria penitenciária através de médicos internos como ginecologistas e clínicos gerais, e caso necessário, tratamento externo. O projeto não gerou desconforto nem risco para as pacientes.

3.2 Anamnese

Foi realizada a anamnese (Figura 4) para dados estatísticos e epidemiológicos e posterior comparação com os fatores de risco já estabelecidos na literatura e citados na introdução envolvendo perguntas referentes a dados pessoais, como o estado civil, idade, número de filhos, realizações anteriores de exame preventivo, tempo de detenção e pena, uso de prótese dentária, presença de lesão oral, saneamento básico residencial, grau de escolaridade, tabagismo, idade de início da atividade sexual, número de parceiros sexuais totais, número de parceiros sexuais nos últimos seis meses, tipo de sexo praticado, opção sexual, renda mensal anterior, número de abortos, etilismo, uso de drogas, tratamentos anteriores e históricos familiares de câncer.

Nome: _____
 Idade: _____ Caso: _____ DUM: _____ Data da coleta: ____/____/____
 Responsável pela coleta: _____ Matrícula: _____

1. Estado civil: Casada () Separada () Solteira () Outros ()
2. Filhos: Não () Sim () Quantos: _____
3. Tempo de internação: _____ Tempo de pena: _____
4. Já fez exame preventivo (Papanicolau)? Sim () Não ()
 Regularmente: () Uma vez: () Raramente: ()
5. Faz uso de prótese dentária? Sim () Não () Tempo: () anos
6. Tem ou teve algum tipo de lesão na boca? Não () Sim ()
 Qual? _____
7. Grau de escolaridade: Nenhum () Fundamental- até a 4ª série ()
 Médio- até a 8ª série () 2º Grau () Superior Incompleto ()
 Superior completo ()
8. Possuía saneamento básico? Sim () Não ()
9. Qual era sua renda mensal média antes de detenção? _____
10. Fumante? Sim () Não () → Intenso () Moderado ()
11. Idade de início de atividade sexual: _____
12. Número de parceiros (as) desde o início da atividade sexual: _____
13. Uso de preservativo: _____
14. Abortos? Sim () Não () Quantos? _____
15. Opção sexual : Homossexual () Bissexual () Heterossexual ()
16. Parceiras internas? Não () Sim () Quantas? _____
17. Fez algum tipo de tratamento? Não () Sim () Câncer ()
20. Uso de drogas: Sim () Não () 21. Uso de álcool: Sim () Não ()

Resultados:

Colposcopia: _____
 Citologia: _____
 PCR: _____

Figura 4. Questionário realizado para cada paciente anteriormente a coleta. A anamnese cuidadosa seleciona as pacientes com principais fatores de risco, como atividade sexual, múltiplos parceiros sexuais, não realização freqüente de exame preventivo, entre outros, servindo posteriormente para dados epidemiológicos e estatísticos.

3.3 Citologia convencional

Após questionário realizou-se duas coletas cérvico-vaginal por um método convencional de esfregaço em lâmina. O material cérvico-vaginal foi colhido com espátula de Ayre da parede vaginal, fundo de saco e colo do útero na porção da Junção Escamo Colunar (JEC) e com escova de cerdas plásticas no canal endocervical. O material dos esfregaços foi fixado utilizando-se um fixador composto por álcool 95° e uma composição de polietilenoglicol da marca Citofix® (Koss & Gompel, 2000). As amostras de esfregaços citológicos foram submetidas à coloração convencional de Papanicolaou e analisadas em microscopia óptica no Laboratório IN CITO Citologia Diagnóstica pelo Dr. Marco Antonio Zonta. As alterações celulares foram classificadas baseadas no Sistema Bethesda, 2001.

Todo o material de coleta, com exceção de lâminas e do Kit SurePath™ Pap Test da empresa BD - Worldwide, foi fornecido pela coordenadoria da Penitenciária Feminina de Sant'ana.

3.4 Imunocitoquímica

Para a reação de imunocitoquímica, as lâminas convencionais ficaram submergidas 24 horas em Etanol Absoluto para completa retirada do fixador, passando em seguida por processo de regressão alcoólica, posteriormente em H₂O destilada para evitar a secagem do material. Em seguida foi realizada a recuperação antigênica em suporte com Tampão Citrato pH 6,0 10mM, aquecido a 95°C por 5 minutos. Uma vez que o material atingiu a temperatura ambiente, após 30 minutos em repouso, as amostras foram lavadas com H₂O destilada e em seguida foi realizado o bloqueio da Peroxidase Endógena utilizando-se solução de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) a 3% por 20 minutos. As amostras foram bloqueadas por completo com BSA 2% (66kDa), diluído em PBSA por 1 hora em câmara úmida semi-aberta a 37°C e limpadas cuidadosamente. Em seguida foi adicionado às lâminas o anticorpo primário Anti-MMP-9 (MsxHu MMP-9/MILLIPORE MAB 13415) diluído em BSA 2% e incubadas por 2 horas em câmara úmida fechada a 4°C mantendo BSA 2% para os controles sem anticorpo primário. As lâminas foram então lavadas 3 vezes com

PBSA por 5 minutos cada e adicionado o Anticorpo Secundário (Solução Amarela da BIOTINYLATED LINK UNIVERSAL) do Kit LSAB + System-HRP-K0690 (DAKO Cytomation), de 2 a 3 gotas em cada corte, incubando em câmara úmida por 30 minutos a 37°C. Uma nova lavagem das lâminas foi realizada por 3 vezes com PBSA por 5 minutos cada. Para a Estreptavidina, as lâminas foram incubadas com complexo STREPTAVIDIN-HRP (Solução Vermelha do kit LSAB) com adição de 2 a 3 gotas na superfície do material e incubadas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C e novamente lavadas 3 vezes com PBSA por 5 minutos cada. Para revelação do processo, as lâminas foram incubadas em solução substrato Diaminobenzidina (DAB – 80mg%) durante 3 a 5 minutos a 37°C em câmara úmida. Foram lavadas em H₂O destilada por 3 minutos e contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto sendo lavadas novamente com H₂O destilada. Foi realizada uma progressão alcoólica e montagem das lâminas com Entellan (Merck) para leitura em microscopia óptica comum. Em seguida, as lâminas foram observadas ao microscópio óptico para análise do desenvolvimento de precipitado castanho-dourado, como produto final da reação, e a marcação foi classificada pela intensidade da coloração: fraca (+), moderada (++), forte (+++) ou ausente (-) conforme sugerido pela literatura (Davidson *et al.*, 1999; Brummer *et al.*, 2002; Sheu *et al.*, 2003; Belhocine *et al.*, 2010). As fotos foram obtidas com a utilização do software Nikon ACT-1 DXM 1.200C.

4 RESULTADOS

4.1 Material coletado

O material cérvico-vaginal de 630 pacientes foi coletado por nós do Laboratório de Citologia e Patologia da FCF-USP, juntamente com a equipe do Laboratório IN CITO e da Infectologia da UNIFESP, no período de Agosto de 2009 até Agosto de 2010.

Foram coletadas, no total, amostras de 630 pacientes para diagnóstico citológico e destas 621 também foram coletadas lâminas processamento da técnica de imunocitoquímica.

Dentre as 621 para imunocitoquímica, 134 amostras de pacientes também foram coletadas em material líquido com o Kit SurePath™ Pap Test da BD - Worldwide para processamento posterior da técnica de citologia líquida. Embora não tenha sido realizada neste estudo, a detecção e tipagem viral, a coleta em meio líquido tem a capacidade de preservar o DNA-HPV por até 3 anos o DNA do HPV, caso esteja presente, possibilitando a posterior detecção e tipagem.

4.2 Anamnese

Os dados das anamneses descritos no próximo item apresentam-se na Tabela 2.

4.2.1 Perfil das 630 pacientes

As anamneses das 630 pacientes revelam que a maioria das pacientes apresenta idade entre 18 e 30 anos, caracterizando o perfil da população carcerária do país. Aproximadamente a metade 51% (325/630) das pacientes informaram que não realizavam com frequência o exame preventivo de Papanicolaou e, apenas 9% (58/630) informaram não possuíam saneamento básico adequado em suas residências.

Dentre as 630 presas, 76% (477/630) delas informaram ter o hábito de fumar de forma intensa ou moderada.

O início de atividade sexual da maioria, 62% (389/630), foi antes dos 15 anos. As pacientes que se relacionaram sexualmente com nenhum ou menos de 10 parceiros ao longo da vida somam 78% (490/630) enquanto 22% (140/630) informaram que se relacionaram com múltiplos parceiros sexuais (Tabela 2).

A frequência do uso de preservativos em todas as relações foi baixa quando comparado ao número de mulheres que relataram o uso esporádico ou ausente do método contraceptivo de 92,5% (583/630). As 425 (67%) pacientes que relataram o uso de bebidas alcoólicas descreveram como sendo este do tipo “social”. A opção sexual predominante na Penitenciária é a Heterossexual com índice de 74% (472/630) nas pacientes (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados estatísticos obtidos através das anamneses das pacientes coletadas, mostrando a distribuição de fatores de risco nos diferentes laudos citopatológicos. Inflam = inflamatório, LSIL = lesão de baixo grau, HSIL = lesão de alto grau.

Variáveis	Total	NORMAL	INFLAM	LSIL	HSIL	TUMOR
Número de pacientes	630	45	494	69	12	4
Idade						
18 a 30 anos	367	22	292	41	6	2
31 a 50 anos	236	23	178	27	5	1
> 50 anos	27	0	24	1	1	1
Papanicolaou						
Nunca	108	5	83	13	5	1
Uma vez	83	10	59	11	1	1
Raramente	134	7	112	12	2	1
Regularmente	305	23	240	33	4	1
Saneamento básico						
Não	58	4	47	4	1	1
Sim	572	41	447	65	11	3
Início de atividade sexual						
Nunca	6	1	5	-	-	-
1 aos 15 anos	390	26	309	40	7	3
16 aos 25 anos	232	18	179	28	5	1
> 25 anos	2	-	1	1	-	-
Número de parceiros sexuais						
Nenhum	6	1	5	-	-	-
Até 10	484	36	380	49	10	3
11 a 50	106	5	84	15	2	-
> 50	34	3	25	5	-	1
Opção sexual						
Heterossexual	472	30	374	54	6	2
Homossexual	46	4	33	8	1	-
Bissexual	112	11	87	7	5	2
Uso de preservativo						
Nunca	162	12	123	17	6	3
Às vezes	392	24	318	42	4	-
Sempre	76	9	53	10	2	1
Etilismo						
Não	205	13	165	19	5	2
Sim	425	32	329	50	7	2
Uso de drogas						
Não	229	15	186	20	4	2
Sim	401	30	308	49	8	2
Tabagismo						
Não fumante	153	14	119	14	3	3
Moderado	181	9	152	13	2	1
Intenso	296	22	223	42	7	-

4.2.2 Perfil das pacientes com laudo citológico sem lesão ou inflamação

Obtivemos laudo normal nos esfregaços de 45 pacientes, sendo que 91% (41/45) iniciaram atividade sexual antes dos 20 anos, apenas 19% (9/45) usavam preservativo com frequência e apenas 18% (8/45) tiveram mais de 10 parceiros sexuais.

Faziam Papanicolaou com frequência 51% (23/45) e 91% (41/45) possuíam saneamento básico.

4.2.3 Perfil das pacientes com processo inflamatório inespecífico e específico

Das 494 pacientes com inflamação, tanto inespecífica quanto específica, 89% (441/494) das pacientes usavam preservativos às vezes ou nunca e 22% (109/494) tiveram mais de 10 parceiros sexuais. Não tinham saneamento básico em suas residências 9,5% (47/494) das pacientes.

4.2.4 Perfil das pacientes com algum grau de lesão

Em relação aos esfregaços da cérvix-vaginal, das 85 pacientes com lesões (69 de baixo grau, 12 de alto grau e 4 tumores) apenas 27 % (23/85) tiveram mais de 10 parceiros sexuais, porém 85% (72/85) delas responderam usar preservativos às vezes ou nunca, e mais da metade 59% (50/85) iniciaram atividade sexual antes dos 15 anos.

Das amostras com lesões, em relação ao total de 630 pacientes, 9,5% (69/630) apresentaram LSIL, 2% apresentaram HSIL e 0,6% (4/630) apresentaram sinal de malignidade.

Das 4 pacientes com alterações citológicas caracterizando malignidade (2 adenocarcinomas *in situ* e 2 carcinomas invasivos), 75% (3/4) revelaram nunca terem usado preservativo e terem iniciado atividade sexual antes dos 15 sendo que uma paciente iniciou com 17 anos. Das 4 pacientes com tumor apenas 1 revelou fazer preventivo de Papanicolaou regularmente.

4.3 Definição de laudo citopatológico

Os laudos citopatológicos seguiram a terminologia do Sistema de Bethesda introduzido em 1998 e revisado em 2001, em uso rotineiro pelo Laboratório IN CITO, onde o laudo normal sem sinal de lesão ou malignidade se dá através da ausência de alterações morfológicas nas células escamosas e glandulares.

No laudo inflamatório são observados polimorfonucleares geralmente abundantes e alterações celulares como binucleação, halo perinuclear, hipercromasia, vacuolização, rarefação nuclear, perda dos bordos citoplasmáticos, metacromasia, entre outros. Os agentes infecciosos possuem características próprias, através das quais podem ser reconhecidos nos esfregaços, além dos sinais de inflamação observados nas células epiteliais como descrito acima (Figura 5).

Os laudos de lesões de baixo grau (LSIL) são dados pelas características de células intermediárias ou superficiais, que mostrem aumento nuclear de até três vezes acompanhando contorno irregular moderado, presença de hipercromasia e cromatina finamente granulada. A principal característica das lesões de baixo grau se caracteriza por um grande halo perinuclear com citoplasmas claro e de contorno suave, denominado “coilócito” (do grego *koilos*, que significa halo ou cavidade). Embora seja o sinal patognomônico da infecção por HPV, o coilócito pode estar ausente, sendo importante a avaliação criteriosa de todos os achados citológicos.

Nas lesões de alto grau (HSIL - carcinoma *in situ*), as alterações celulares compreendem células menores e menos maduras, sendo as da camada basal apresentando aumento nuclear e relação núcleo-citoplasma maior devido ao menor tamanho das células. Diferente de LSIL, a HSIL possui hipercromasia, grânulos de cromatina e os contornos irregulares são mais acentuados (Figura 5).

Nas atipias escamosas de significado indeterminado (ASC-US) são observadas alterações reativas de menor grau do que nas lesões neoplásicas. O núcleo aumenta de duas a três vezes comparadas ao núcleo de uma célula intermediária normal e, podem ser observadas hipercromasia leve e variações no tamanho e forma nuclear (Figura 5).

Para laudo de carcinoma escamoso invasivo pode-se observar queratinização das células, pleomorfismo celular acentuado, formas celulares bizarras como células alongadas e fusiformes. São observadas acidofilia ou orangeofilia citoplasmáticas podendo também ser basofílica. O núcleo ocupa quase todo o

diâmetro do citoplasma e apresenta cromatina picnótica, raros nucléolos podendo haver diátese tumoral associada.

No adenocarcinoma *in situ*, predominam as células em retalhos e fileiras, podendo encontrar rosetas porém, células isoladas são mais raras. Um achado morfológico comum são as bordas irregulares, núcleos redondos amontoados, hipercromáticos e alongados, com variação de tamanho (Figura 5).

Em tumor glandular invasivo, como o adenocarcinoma invasivo, observa-se dissociação celular, células tumorais em retalhos, rosetas, fileiras e sincício podendo o núcleo se apresentar circular ou irregular com acentuado pleomorfismo com pequenos nucléolos, dependendo do grau de diferenciação tumoral.

Figura 5. Ilustração das alterações morfológicas encontradas nas amostras das 630 pacientes, baseadas no Sistema Bethesda, 1998, coradas por Papanicolaou e analisadas por microscopia de luz convencional. LSIL = lesão intraepitelial de baixo grau. HSIL = lesão intraepitelial de alto grau. Aumento 400x. Setas: **1 e 2.** Célula normal sem alterações morfológicas. **3.** células com reações inflamatórias e presença de polimorfonucleares. **4.** atipia nuclear. **5.** células superficiais com núcleo alterado. **6.** células da camada basal com núcleo alterado. **7.** células glandulares (endocervicais) alteradas com presença de hemorragia. **8.** célula escamosa alterada com presença de diátese tumoral.

4.4 Laudo citopatológico emitido pelo Laboratório IN CITO

Numa amostragem total de 630 lâminas, foram laudadas 7% (45/630) das lâminas normais, sem sinais de infecção ou lesão (Gráfico 1).

Das 539 lâminas inflamatórias, foram encontradas 58% (314/539) inespecíficas e 33% (180/539) específicas (Gráfico 1). Em relação ao total de inflamações específicas, foi observado um índice de 0,5% (1/180) de *Trichomonas vaginalis* juntamente com *Leptothrix sp*, 1% (2/180) de *Leptothrix sp*, 1% (2/180) de *Actinomyces sp*, 1% (2/180) de *Chlamydia trachomatis*, 2% (3/180) de Herpes vírus, 8% (15/180) *Lactobacillus sp*, 17% (31/180) de *Cândida sp*, 23% (41/180) *Trichomonas vaginalis* e 46% (83/180) de vaginose Bacteriana (*Gardnerella vaginalis*) (Gráfico 2).

De 630 pacientes foram encontradas 6 ASC-US (Gráfico 1) representando 1% das amostras totais sendo que um ASC-US apresentava vaginose bacteriana.

Das 180 amostras apresentando inflamação específica, em relação ao número total de 630 pacientes, foi observado um índice de 0,15% (1/630) de *Trichomonas vaginalis* juntamente com *Leptothrix sp*, 0,3% (2/630) de *Leptothrix sp*, 0,3% (2/630) de *Actinomyces sp*, 0,3% (2/630) de *Chlamydia trachomatis*, 0,48% (3/630) de Herpes vírus, 2,4% (15/630) *Lactobacillus sp*, 5% (31/630) de *Cândida sp*, 6,5% (41/630) *Trichomonas vaginalis* e 13% (83/630) de vaginose Bacteriana (*Gardnerella vaginalis*) (Gráfico 2).

No grupo onde se encontram as lesões que também apresentam agentes infecciosos, foram laudados 17 esfregaços, sendo 6% (1/17) de HSIL com vaginose bacteriana, 6% (1/17) LSIL com *Cândida sp*, 6% (1/17) LSIL com Herpes vírus, 53% (9/17) LSIL com *Gardnerella vaginalis* e 29% (5/17) LSIL com *Trichomonas sp* totalizando 94% de amostras (16/17) LSIL com agentes.

Das 64 lâminas de lesões na ausência de agentes ,17% (11/64) HSIL e 83% (53/64) LSIL (Gráfico 1).

Das 4 lesões malignas, que não apresentaram agentes infecciosos, 50% (2/4) são de Adenocarcinoma *in situ* e 50% (2/4) de Carcinoma invasor. Em relação ao número total de 630 pacientes, os tumores representam 0,6% (4/630) das amostras (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Laudo citopatológico das amostras cérvico-vaginais das 630 pacientes. Os esfregaços citológicos foram analisados pelo laboratório IN CITO. O gráfico representa o total de amostras, que foram divididas entre a presença e a ausência de agentes inflamatórios. LSIL = lesão intraepitelial de baixo grau. HSIL = lesão intraepitelial de alto grau.

Gráfico 2 - Prevalência de agentes infecciosos nas 630 amostras cérvico-vaginais. Os laudos apresentando inflamação específica, foram divididos entre os agentes infecciosos onde a maior prevalência de infecção se dá por vaginose bacteriana, seguida por *Trichomonas vaginalis*.

4.5 Imunocitoquímica

4.5.1 Padronização do método

O método de imunocitoquímica foi padronizado nas lâminas cérvico-vaginais, as quais foram divididas em duas regiões, uma para controle da reação sem adição do anticorpo primário Anti-MMP-9 e outra porção com adição do anticorpo primário. A marcação de imunocitoquímica da proteína MMP-9 nos esfregaços vaginais (Figuras 6) mostrou-se heterogênea, observando-se marcação citoplasmática em diferentes tipos celulares, como células escamosas e polimorfonucleares, mais especificamente em neutrófilos. Não houve sinal de marcação na região laminar na ausência do anticorpo primário, confirmando a reação negativa.

Para controle positivo da reação foram utilizadas lâminas histológicas de placenta, cedidas gentilmente pela Dra. Silvana Sandri, do laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF-USP (CEP/FCF nº486). As lâminas de placenta foram escolhidas como controle pelo potencial natural da MMP-9 de participar de processos fisiológicos como o desenvolvimento embrionário e remodelamento tecidual (Figura 6).

Assim como as lâminas cérvico-vaginais, as lâminas de placenta foram divididas em duas regiões, e assim que geramos o controle, consideramos, portanto, que o método poderia ser utilizado para esfregaços cérvico-vaginais e o anticorpo primário.

A padronização da avaliação das amostras após o método de imunocitoquímica foi realizada a fim de encontrar a melhor maneira de reproduzir o resultado da técnica quando há marcação de MMP-9. Foi escolhido o método de cruzes, semi-quantitativo, onde uma cruz (+) representa intensidade fraca, duas cruzes (++) representam intensidade moderada e três cruzes (+++) representam intensidade acentuada, tanto em polimorfonucleares como em células escamosas e glandulares (Figura 7). A determinação da incidência de uma, duas ou três cruzes se dá pela intensidade de marcação mais aparente na lâmina. As cruzes não se aplicam onde não há intensidade (-), estando ausente a marcação (Davidson *et al.*, 1999; Brummer *et al.*, 2002; Sheu *et al.*, 2003; Belhocine *et al.*, 2010).

Posteriormente à padronização, seguiu-se com a técnica de imunocitoquímica nas lâminas restantes a fim de atingir o objetivo do projeto.

Figura 6. Padronização de imunocitoquímica para MMP-9. Campos aleatórios da reação em esfregaços cérvico-vaginais. As amostras de placenta foram utilizadas como controle positivo da reação, mostrando a marcação positiva. CN = controle negativo sem anticorpo primário, não apresentando marcação. Aumento 400x.

Figura 7. Padronização de imunocitoquímica para MMP-9. Campos alternativos da reação em esfregaços cérvico-vaginais. Uma cruz (+) apresentando fraca marcação da proteína, duas cruces (++) apresentando moderada marcação e três cruces (+++) apresentando intensa marcação, tanto em células escamosas como em polimorfonucleares. CN: controle negativo sem anticorpo primário. Aumento 1000x.

4.5.2 Imunocitoquímica nas amostras das pacientes

A marcação de imunocitoquímica da proteína MMP-9 nos esfregaços vaginais se mostrou heterogênea, considerando apenas as células escamosas, observando-se marcação citoplasmática dependente do diagnóstico citológico. Entretanto a marcação independe do tipo celular alterado, podendo estar presente em células normais e/ou ausentes em células alteradas.

Das 630 amostras de pacientes coletadas, 45 foram laudadas como normais (Gráfico 1), sem sinal de infecção e negativas para lesão ou sinal de malignidade. Das 45 lâminas normais submetidas à reação de imunocitoquímica, 20% (9/45) não apresentaram sinal de marcação para MMP-9, com raros polimorfonucleares, em células escamosas marcadas. A maioria das lâminas, 71% (32/45), apresentaram sinal fraco de marcação tanto em células escamosas como em polimorfonucleares e 9% (4/45) apresentaram sinal moderado de marcação (Figura 8).

Figura 8. Representação ilustrativa do gráfico 3, das imunocitoquímicas das 45 lâminas normais com marcação ausente em 20% das células escamosas, intensidade fraca em 71% das amostras e intensidade moderada de marcação em 9% das lâminas. Aumento 400x.

Das 312 inflamações inespecíficas, menos de 1% (1/312) não apresentou células no esfregaço para serem analisadas, consideradas insatisfatórias para leitura segundo Sistemas Bethesda, 2011. Não apresentaram marcação para a MMP-9 10% (31/312), 77,5% (242/311) das lâminas apresentaram intensidade fraca de marcação, 11% (34/311) apresentaram intensidade moderada e 1% (3/311) apresentaram sinal intenso de marcação (Figura 9).

Figura 9. Representação ilustrativa do gráfico 3 das imunocitoquímicas das 312 lâminas inflamatórias inespecíficas com marcação fraca ausente em 10% das lâminas, fraca em 77,5%, moderada em 11% e intensa em 1% das amostras. Aumento 400x.

Das 177 amostras de inflamações específicas com presença de agentes infecciosos, menos de 1% (1/177) não apresentou células no esfregaço para serem analisadas. Não apresentaram marcação para MMP-9 10% (18/177), 78% (138/177) apresentaram expressão de marcação fraca, 10% (18/177) apresentaram expressão moderada e 2% (3/177) apresentaram expressão acentuada (Figura 10).

Inflamatório específico - presença de agente infeccioso

Figura 10. Representação ilustrativa do gráfico 3 das imunocitoquímicas das 176 lâminas inflamatórias específicas, com marcação ausente em 10%, intensidade fraca em 78%, moderada em 10% e acentuada em 2% das amostras. Aumento 400x.

Das 50 lesões de baixo grau (LSIL), 76% (38/50) das lâminas apresentaram expressão fraca e 24% (12/50) apresentaram expressão moderada (++) para MMP-9 (Figura 11).

Das 16 amostras laudadas com LSIL associadas à presença de algum agente infeccioso, 62,5% (10/16) amostras apresentaram uma expressão fraca, 31,5% (5/16) expressão moderada e 6% (1/16) apresentaram expressão acentuada (Figura 11).

Figura 11. Representação ilustrativa do gráfico 3, nas duas primeiras colunas, das imunocitoquímicas das 50 lâminas LSIL com expressão fraca em 76% e moderada em 24% das amostras. Nas duas colunas da direita, a figura representa também as 16 amostras de LSIL associadas a agentes infecciosos com expressão fraca em 62,5% das amostras, moderada em 31,5% e acentuada em 6% das amostras. Aumento 400x.

Entre as lesões de alto grau (HSIL) a reação para MMP 9 apresentou-se positiva em 100% (10/10) amostras submetidas a imunocitoquímica uma expressão

moderada (++) para MMP-9 marcando tanto polimorfonucleares neutrófilos quanto células escamosas (Figura 12).

A única amostra HSIL com algum agente infeccioso coletada entre as 630 amostras totais apresentou na imunocitoquímica uma marcação para MMP-9 fraca (+) em células escamosas (Figura 12).

Figura 12. Representação ilustrativa do gráfico 3, das lesões de alto grau. imunocitoquímicas das 11 lâminas de HSIL com expressão moderada em 100% e expressão fraca em 100% da amostra associada a vaginose bacteriana. Aumento 400x.

As 4 amostras tumorais foram submetidas a imunocitoquímica onde 100% (2/2) das amostras com carcinoma escamoso apresentaram expressão acentuada (+++) para MMP-9. As lâminas de adenocarcinoma *in situ* apresentaram 50% (1/2) de expressão moderada (++) e 50% (1/2) de intensidade acentuada (+++) (Figura 13).

Figura 13. Representação ilustrativa do gráfico 1, das imunocitoquímicas das 4 amostras tumorais, apresentando 100% de marcação intensa nos carcinomas escamosos invasivos, e 50% de marcação moderada e 50% de marcação acentuada nos adenocarcinomas. Aumento 400x.

Observa-se no gráfico 3, um aumento da expressão da MMP-9 conforme a progressão de lesões. O gráfico 3 representa a expressão da proteína apenas em células escamosas, sem representação da expressão em células do sistema imunológico como os polimorfonucleares, que apresentaram expressão moderada ou acentuada em 90% das lâminas, independente do laudo citopatológico.

Gráfico 3 - Dados da progressão da intensidade de MMP-9 nas amostras cérvico-vaginais de 621 pacientes. Observa-se um aumento da expressão da proteína correlacionando-se com a progressão e gravidade das lesões. Observa-se ainda, que em lâminas LSIL associadas a algum agente infeccioso, há um aumento da expressão da proteína, quando comparadas com as lâminas LSIL sem algum agente infeccioso. No entanto, pode-se observar o contrário nas lâminas HSIL, quando na presença do agente há uma menor expressão da proteína. Duas lâminas, uma inflamatória inespecífica e outra inflamatória específica, não apresentaram células para serem analisadas. LSIL = lesão intraepitelial de baixo grau. HSIL = lesão intraepitelial de alto grau. ASC-US = atipia celular escamosa de significado indeterminado.

Como citado, a MMP-9 também atua como proteína pró-inflamatória em processos patológicos ou inflamatórios e, por este motivo, verificou-se a expressão de MMP-9 em células de polimorfonucleares, presentes nas lâminas cérvico-vaginais.

Observou-se que mesmo em lâminas normais, houve grande quantidade de polimorfonucleares encontrados, em sua maioria neutrófilos, marcados pela proteína. Nas lâminas normais, 27% (12/45) das amostras não apresentaram polimorfonucleares, 4% (2/45) não apresentaram nenhum sinal de marcação, 29% (13/45) apresentaram uma marcação fraca, 11% (5/45) apresentaram marcação moderada e 29% apresentaram sinal intenso de marcação (gráfico 4).

Das 312 lâminas inflamatórias inespecíficas, 1 % (4/312) não apresentou células para serem analisadas, 6,5% (20/312) não apresentaram marcação, 46% (143/312) apresentaram sinal fraco, 39,5% (123/312) apresentaram sinal moderado e 7,0% (22/312) apresentou sinal intenso de marcação (Gráfico 4).

Em relação as 177 lâminas inflamatórias específicas, 2% (3/177) não apresentaram células para serem analisadas, 6% (10/177) não apresentaram sinal de marcação, 52% (92/177) apresentaram sinal fraco, 39% (69/177) apresentaram sinal moderado e 2% (3/177) apresentaram sinal intenso de marcação (Gráfico 4).

Das 6 lâminas com atipia indeterminada de células escamosas (ASC-US), 17% (1/6) não apresentaram sinal de marcação, 50% (3/6) apresentaram sinal fraco, 17% (1/6) apresentaram sinal moderado e 17% (1/6) apresentaram sinal intenso de marcação (Gráfico 4).

Entre as 50 lâminas LSIL, 2% (1/50) não apresentaram células para serem analisadas, 38% (19/50) apresentaram sinal fraco, 48% (24/50) apresentaram sinal moderado e 12% (6/50) apresentaram sinal intenso de marcação (Gráfico 4). Das 16 lâminas LSIL associadas a algum agente infeccioso, 25% (4/16) apresentaram sinal fraco, 69% (11/16) apresentaram sinal moderado e 6% (1/16) apresentaram sinal intenso de marcação (Gráfico 4).

Das 11 lâminas HSIL, 9% (1/11) apresentaram sinal fraco, 27% (3/11) apresentaram sinal moderado e 64% (7/11) apresentaram sinal intenso de marcação (Gráfico 4). Na única lâmina HSIL associada a agente infeccioso a marcação se mostrou intensa.

Nas 4 lâminas tumorais, duas de adenocarcinoma e duas de carcinoma escamoso invasivo, a expressão em polimorfonucleares se mostrou acentuada em 100% das amostras.

Gráfico 4 - Dados da progressão da intensidade de MMP-9 em polimorfonucleares, nas amostras cérvico-vaginais de 621 pacientes. Observa-se um aumento da expressão da proteína correlacionando-se com a progressão e gravidade das lesões. LSIL = lesão intraepitelial de baixo grau. HSIL = lesão intraepitelial de alto grau. ASC-US = atipia celular escamosa de significado indeterminado.

Como mostrado no Gráfico 5, é proporcional a intensidade de marcação de MMP-9 em células escamosas e polimorfonucleares, quando comparados à presença de inflamações e progressão de lesões.

Proporcionalmente ao número de amostras em cada segmento diagnóstico, observa-se no Gráfico 5, que em lâminas normais e inflamatórias a prevalência de marcação é fraca. Nas lesões de baixo e alto grau, a intensidade de marcação se equilibra entre moderada e intensa, e nas amostras tumorais, tanto as células escamosas quanto os polimorfonucleares apresentam uma marcação proteica intensa.

Gráfico 5 - Dados da progressão da intensidade de MMP-9 correlacionando células escamosas com polimorfonucleares, nas 621 pacientes. Observa-se um aumento da expressão da proteína em seguimento a a progressão e gravidade das lesões. LSIL = lesão intraepitelial de baixo grau. HSIL = lesão intraepitelial de alto grau. ASC-US = atipia celular escamosa de significado indeterminado.

5 DISCUSSÃO

As neoplasias cervicais são conhecidas por terem relação com fatores de risco que podem ter um papel importante na progressão das lesões como tabagismo, uso de contraceptivos, nutrição, múltiplos parceiros e ausência do uso de preservativos (Nam *et al.* 2009; Villa *et al.*, 2009). O início precoce da atividade sexual, higiene inadequada, baixo nível sócio econômico e a não realização de exames preventivos também caracterizam os principais fatores de risco (Nam *et al.* 2009; Villa *et al.*, 2009).

Seguindo os relatos da literatura em relação aos fatores de risco, avaliamos as anamneses das pacientes e os resultados estatísticos revelaram que de todas as 585 pacientes, 38% não fazem ou nunca fizeram Papanicolaou, que 76% fazem uso intenso ou moderado do cigarro, que 65% se relacionaram sexualmente com menos de 10 parceiros e que apenas 37% iniciaram atividade sexual depois do 17 anos.

Das 81 mulheres com lesões 27% tiveram mais de 10 parceiros porém 58% iniciaram atividade sexual antes dos 17 anos e 85% usavam preservativos às vezes ou nunca. Mostramos com nossas estatísticas, que as mulheres que apresentam lesões ou malignidade são as pacientes que mais apresentam fatores de risco em seus hábitos de vida, como também relatam autores como zur Hausen, 2002, Rabelo-Santos, 2003, Nam *et al.* 2009, Villa *et al.*, 2009, entre outros.

Os resultados da citologia convencional revelaram o alto índice de infecções por agentes infecciosos causadores de doenças, pela ausência do uso de preservativos e alto número de parceiros sexuais, sendo a maior incidência por vaginose bacteriana, que tem como prevalência a bactéria *Gardnerella vaginalis*, representando 46% das inflamações específicas e 13% das amostras totais.

Nossos dados anteriores são semelhantes ao estudo de Murta *et al.*, 2000, que evidenciou a *Gardnerella vaginalis*, causadora também da vaginose bacteriana, mostrou que esta bactéria é altamente incidente, variando de 2 a 58% das infecções. Foi sugerido que essa bactéria esteja relacionada com o desenvolvimento de neoplasias, como co-fator do HPV.

Outros estudos como de Stori-Filho *et al.*, 2010, mostrou que a prevalência de *G. Vaginalis* variou em 3-6,5% da população feminina de Maringá-PR/Brasil tanto do Sistema único de saúde como em pacientes utilitárias de planos de saúde. Em 2008, o mesmo autor revelou uma prevalência de 14-20% de clue-cells, indicativas de

vaginose bacteriana, na população brasileira. Desta forma, a comunidade carcerária apresentou índices semelhantes aos da população geral.

O protozoário *Trichomonas vaginalis* foi encontrado em 6,5% das amostras totais e 23% das inflamações específicas e em 7% das lesões de baixo grau da cérvix-uterina. Este dado é importante, pois evidencia a alta incidência de *Trichomonas vaginalis* em mulheres com pouco acesso a programas de prevenção pois Leon *et al.*, 2009, revelou que a tricomoníase está relacionada com problemas de saúde reprodutiva, como doença pélvica inflamatória, baixo peso no nascimento e parto prematuro. A infecção por *Trichomonas vaginalis* depende de vários fatores, como idade, atividade sexual e múltiplos parceiros sexuais (Leon *et al.*, 2009). Como a maioria das infecções do trato genital, a infecção por *Trichomonas Vaginalis* em pacientes do sexo feminino, causa sintomas como dispareunia, corrimento vaginal, disúria e prurido vulvar (Maciel *et al.*, 2004; Loo *et al.*, 2009).

A infecção por *Trichomonas vaginalis* foi relacionada com um maior risco de transmissão pelo HIV, por sua capacidade de macerar e causar erosão ao colo uterino facilitando a entrada pelo vírus HIV, seu diagnóstico precoce se torna um importante passo na saúde pública, evitando a transmissão em parceiros sexuais, devido a maioria das mulheres infectadas serem assintomáticas (Maciel *et al.*, 2004; Loo *et al.*, 2009)

Através da citologia convencional, o vírus do Herpes simples foi encontrado em 2% das inflamações específicas, menos de 1% das amostras totais e 1% das lesões de baixo grau. *Chlamydia trachomatis* foi encontrada em 1% das inflamações específicas, em menos de 1% das amostras totais e em nenhum caso de lesão, assim como *Leptothrix sp.* *Actinomyces sp* foi encontrado em 1% inflamações específicas na cérvix e em menos de 1% das amostras totais.

O fungo *Cândida sp* foi encontrado em 17% das inflamações específicas, 5% das amostras totais e em 1% das lesões de baixo grau.

Voog *et al.*, 1995, sugeriram a possibilidade da infecção por *Cândida sp* ativar a infecção latente por HPV, pois já se sabe que alterações na flora vaginal pode gerar uma predisposição para infecção do HPV.

As infecções causadoras das doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), como vaginose bacteriana (*Gardnerella vaginalis*), *Chlamydia trachomatis* e *Trichomonas vaginalis*, sugere-se que podem ter papel na progressão de

neoplasias, por alterarem mecanismos de defesa podendo facilitar a infecção pelo HPV (Nam *et al.* 2009; Villa *et al.*, 2009).

Outro ponto importante nas inflamações é a relação das MMPs com os processos de inflamatórios. Um possível mecanismo das MMPs pode ser a participação das MMPs nas células de defesa contra o tumor através da atividade de modulação de quimiocinas e citocinas (Roy *et al.*, 2009). Recentes estudos sugeriram que as MMPs reconhecem substratos da matriz extracelular envolvidos não só na regulação celular a na reparação tecidual, como também na inflamação (Kucknoor *et al.*, 2005; Imtiaz *et al.*, 2007). Por este motivo tem sido sugerida uma possível relação da expressão de MMPs com inflamações crônicas, em resposta a infecção por agentes como *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, entre outros, sendo necessários estudos complementares para desvendar o possível papel das MMPs também nas inflamações (Kucknoor *et al.*, 2005; Imtiaz *et al.*, 2007).

Em relação as MMPs é importante ressaltar que principalmente a MMP-2 e MMP-9 estão relacionadas com o remodelamento da matriz extracelular, como em tumores benignos ou estados fisiológicos normais, como a embriogênese, e também com a degradação da matriz, como em tumores malignos e metástase (Libra *et al.*, 2009; No *et al.*, 2009, Roy *et al.*, 2009). Como citado, a invasão estromal e metástase distante são passos na progressão da malignidade tumoral e envolve degradação da membrana basal com subsequente remodelamento da matriz extracelular.

O papel das metaloproteinases de matriz, por degradar virtualmente todos os elementos de matriz extracelular, é valorizado em estudos de câncer onde se avaliam a expressão, atividade e função dessas MMPs. Especialmente em neoplasias cervicais, vários trabalhos contemplam a relação de MMP e progressão tumoral (Benaud *et al.*, 1998; Singer *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002; Gaiotto *et al.*, 2004; Libra *et al.*, 2009). Já é avançado o número de estudos das MMPs, em amostras derivadas de biópsia, relatando a maior expressão dessas proteínas sempre nos estágios avançados de câncer cervical. Podemos observar este dado, em nosso estudo, revelando que a da expressão de MMP-9 progride conforme o avanço nos graus de lesões e câncer.

A detecção dos níveis, principalmente da MMP-2 e -9, na maioria dos estudos, é vista através de técnicas de imunohistoquímica e zimografia como relatou

Ben Davidson *et al.*, 1999, que estudaram MMP-9 em 15 casos de carcinomas escamosos. Segundo este autor, em 10 casos de neoplasias de alto grau e em 10 casos normais, observou-se a marcação de MMP-9 em imunohistoquímica em 72% de células neoplásicas, em 50% das lesões e apenas 10% nos controles, sugerindo a MMP-9 como um possível marcador precoce da progressão tumoral de lesões escamosas da cérvix-uterina.

Hong *et al.* 2000, avaliaram 19 casos metastáticos de carcinoma espinocelular oral e 25 não-metastáticos, também por imunohistoquímica e zimografia, e verificaram que os níveis de MMP-2 e -9 são indicadores do potencial de invasão, sendo que a frequência da expressão da MMP-9 foi maior da de MMP-2.

Sheu *et al.*, 2003, estudaram o papel de MMPs na progressão tumoral através da expressão de MMPs e inibição de seus inibidores, e relataram que MMP-2 e MMP-9 foram expressas em 13% de casos normais e 13% de casos de lesão de baixo grau em contraste com uma expressão de 83%-100% em lesões de alto grau e mais de 90% de expressão em casos de carcinomas escamosos, o que ocorreu também com MMP-1, MMP-14 e MMP-15. Puderam concluir que há uma progressiva hiper-regulação de MMP-2 e -9 em carcinomas escamosos.

Nossos dados refletem o estudo de Sheu *et al.*, 2003, que encontraram expressão também em casos normais, onde também encontramos fraca marcação de MMP-9 em 80% das lâminas normais, que pode referir-se à uma atividade basal. Apesar da MMP-9 ser uma proteína pró-inflamatória e sua secreção estar relacionada a citocinas e fatores de crescimento, também está relacionada a processos fisiológicos normais e interações célula-matriz. Segundo Azambuja Ribeiro *et al.*, 2008, o fato de tanto células normais quanto células tumorais expressarem diversas isoformas de MMPs, está aumentando a redundância de estudos relacionados à MMPs, tornando a interpretação um desafio único. Por outro lado, a marcação de células normais por ser fraca, diferenciam-se das células tumorais que progressivamente apresentam prevalência marcação moderada a intensa.

No *et al.*, 2009, avaliaram por imunohistoquímica, a expressão de MMP-2 e MMP-9 em pacientes com neoplasias intra-epiteliais de grau I (LSIL), II e III (HSIL). O estudo observou que a expressão de MMP-2 não foi associada com o grau das lesões enquanto que a MMP-9 esteve expressa em 20-22% em NIC I e II e em

47,4% de NIC III onde foi sugerido que MMP-9 pode desempenhar um papel importante na progressão das lesões.

Jensen *et al.*, 2010, concluíram, após avaliarem por imunohistoquímica os níveis de MMP-9 e TIMP-1 em biópsia 340 pacientes com carcinoma colorretal em estágios II-IV tratadas com 5-fluorouracil, que os resultados da expressão sugerem que a interação com o câncer e seus diversos efeitos, dependem da expressão dessas proteínas em células do estroma e células cancerosas, tornando esse reconhecimento como fundamental para a aplicação como marcadores prognósticos e em terapias que tenham as MMPs como alvo específico.

Como citado anteriormente, as MMPs mantêm um importante papel na progressão das lesões. Sendo assim, padronizamos os estudos imunocitoquímicos em esfregaços cérvico-vaginais, através da padronização da expressão de MMP-9, e observamos uma presença de sinal da MMP-9 em esfregaços cérvico-vaginais com alterações inflamatórias e lesões. Os estudos das MMPs e seu papel no desenvolvimento tumoral e de lesões continua em constante aprimoramento e para explorar minuciosamente nossos dados é necessário que seja maior o número de amostras analisadas.

Em estudo de revisão da literatura, Libra *et al.*, 2009, revelaram estudos que suportam a possibilidade de superexpressão de MMPs, principalmente a MMP-2 e -9, na promoção do crescimento tumoral e metástase.

O fato das MMPs estarem relacionadas com células de defesa, por serem proteínas pró-inflamatórias, foi mostrado nos dados deste estudo, onde 97% das amostras apresentaram marcação fraca (+), moderada (++) ou acentuada (+++) em polimorfonucleares.

Já é sabido e bem descrito na literatura que a MMPs possuem papel fundamental na progressão de tumores, porém tais estudos foram consolidados de amostras provenientes de biópsia, procedimento este classificado invasivo por depender da retirada cirúrgica de um fragmento. Em contrapartida não observa-se na literatura estudos avaliando a expressão das MMPs em esfregaços, que tem a vantagem de serem usados em exames preventivos de rotina.

Neste aspecto, este estudo é pioneiro por demonstrar o valor da citologia para a interpretação da expressão de MMP-9 e sua correlação com a histologia. Os estudos citológicos poderiam viabilizar um maior poder prognóstico de análise da progressão tumoral através de biomarcadores, pois a expressão e atividade de MMP-9 tem sido

observada continuamente e seu significado prognóstico tem sido provado, como citado anteriormente nos estudos de vários autores.

Uma avaliação de como essas enzimas se relacionam com a progressão das lesões e tumores pode favorecer o surgimento de novas estratégias diagnósticas e prognósticas, e devido a isso torna-se importante a busca por novas técnicas não invasivas, como a coleta e reprodução de esfregaços cérvico-vaginais, que podem tornar possível o diagnóstico a evolução de terapias eficazes para MMPs em pacientes podendo monitorar a atividade da MMP em alvo e os diferentes estágios de progressão.

Nossos dados, até o presente momento, mostram uma evolução da expressão da MMP-9 em esfregaços vaginais conforme a progressão de lesões e presença de inflamações, principalmente quando associadas a agentes infecciosos pois observou-se um aumento da intensidade de marcação, comparativamente ao controle normal.

6 CONCLUSÃO

Como conclusão, nossos dados sugerem, que as mulheres com fatores de risco já estabelecidos possuem maior incidência de lesões. Relatamos também um maior índice na expressão de MMP-9 de acordo com a progressão das lesões quando comparado ao controle normal, dado este semelhante aos dados histopatológicos. Observamos também que as lesões de baixo grau com agentes infecciosos apresentam maior expressão de MMP-9 do que aquelas que não apresentavam agentes, indicando que possivelmente a inflamação específica possa agravar o processo de lesão.

Como observamos o aumento da expressão de MMP-9 em esfregaços cérvico-vaginais tanto em células escamosas quanto em polimorfonucleares, conforme a progressão de lesões, por método de imunocitoquímica, mostramos que este método, portanto, pode vir a ser no futuro um possível biomarcador de evolução de lesão precursora e auxílio preventivo. A imunocitoquímica para MMP-9 em esfregaços cérvico-vaginais poderá ser útil para fins prognósticos quando associados aos métodos de detecção e prevenção de lesões e tumores cervicais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ault K. **Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections in the Female Genital Tract.** Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology vol 2006, art ID 40470, pg 1–5. doi 10.1155/IDOG/2006/40470. 2006.

Amaral R, Manrique E, Guimarães J, Sousa P, Mignoli JR, Xavier A and Oliveira A. **Influence of adequacy of the sample on detection of the precursor lesions of the cervical cancer.** Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. 30(11):556-60. 2008.

Azambuja Ribeiro RIM, Borges Júnior PC, Cardoso SV, Candelori I, Espíndola FS, Cassali GD, Loyola AM. **Expressão de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial • v. 44, n. 2, p. 115-121, Abril 2008.

Baker AH, Edwards DR and Murphy G,*,‡. **Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities.** Journal of Cell Science 115, 3719-3727 © The Company of Biologists Ltd. doi:10.1242/jcs.00063. 2002.

Bauch CT, Li M, Chapman G, Galvani AP. **Adherence to cervical screening in the era of human papillomavirus vaccination: how low is too low?** Lancet Infectious Disease. 2010 Feb;10(2):133-7.

Belhocine M, Gernigon-Spychalowicz t, Jacob M-P, Benazzoug Y and Exbrayat J-M. **Immunoexpression of gelatinase (MMP-2 and MMP-9) in the seminal vesicles and ventral prostate of Libyan jird (*Meriones libycus*) during the seasonal cycle of reproduction.** Histology and Hystopathology – Celular and Molecular Biology. Lyon, France. (2010) 25: 619-636

Boccardo E, Lepique AP, Villa LL. **The role of inflammation in HPV carcinogenesis.** Carcinogenesis. 2010 Nov;31(11):1905-12. Epub 2010 Sep 5. Review.

Bundrick J, Cook D and Gostout B. **Screening for Cervical Cancer and Initial Treatment of Patients With Abnormal Results From Papanicolaou Testing.** Mayo Clinic Proceedings. 2005;80:1063-1068 © 2005.

Burk R, Chen Z and Doorslaer K. **Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity.** Public Health Genomics. 12:281–290. doi: 10.1159/000214919. 2009

Brummer O, Böhmer G, Hollwitz B, Flemming P, Petry KU, Kühnle H. **MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation--an immunohistochemical study.** Germany. Gynecologic Oncology. Feb;84(2):222-7, 2002.

Benaud MM & Fridman R. **Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer.** Breast Cancer Research Treat, v.50(2), p.7-116, 1998.

Campisi G, Panzarella V, Giuliani, M Giuliani, Lajolo C, Di Fede O, Falaschini S, Di Liberto C, Scully C and Lo Muzio L. **Human papillomavirus: Its identikit and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (Review).** International Journal of Oncology; 30: 813-823, 813, 2007.

Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. **Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytological abnormalities.** Bethesda, MD 20892-7234, USA. Jul 20;97(14):1066-71, 2005).

Cohen, J. **Public Health: HPV's Peculiarities, From Infection to Disease.** Science Magazine. April 29, Vol. 308. no. 5722, p. 619, DOI: 10.1126308(5722):619, 2005.

Chakraborti S, Mandal M, Sudip Das, Mandal A and Chakraborti T. **Regulation of matrix metalloproteinases: An overview.** Molecular and Cellular Biochemistry **253**: 269–285, 2003.

Chow LT, Broker TR and Steinberg BM. **The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia.** Journal Compilation. Acta

Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica. doi 10.1111/j.1600-0463.2010.02625.x 2010.

Clifford GM, Gonçalves MAB and Franceschia S. **Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis.** Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 2006, 20:2337–2344. 2006.

Cremerj. Conselho Regional de Medicina do Rio de Janeiro. **Nomenclaturas e Significado dos exames colpocitológicos.** (2007). Disponível em: <https://www.cremerj.org.br/palestras/258.PDF>. Acesso em: 08/02/2009.

da Silva Cardeal L.B, C.A. Brohem, T.C.S. Corrêa, S.S. Maria-Engler, S.M.B. Winnischofer and M.C. Sogayar, F. Nakano, E. Boccardo and L.L. Villa. **Higher expression and activity of metalloproteinases in human cervical carcinoma cell lines is associated with HPV presence.** Biochemistry and Cell Biology. São Paulo. Oct;84(5):713-9, 2006.

de Souza AP, Trevilatto PC, Zaia AA and Line SRP. **Análise bioquímica das metaloproteases da matriz extracelular durante atrofia experimental das glândulas salivares submandibulares em ratos.** Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo, vol.13 n.2, São Paulo Apr./June 1999. doi: 10.1590/S0103-06631999000200006

de Villiers T, Gissmann L and zur Hausen H. **Molecular Cloning of Viral DNA from Human Genital Warts.** Journal of Virology. Vol. 40, No. 3. Dec. 1981, p. 932-935.0022-538X/81/120932-04\$02.00/0. 1981.

Doorbar J. **Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer.** Clinical Science (2006) **110**, 525–541 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/CS20050369. 2006.

Franco EL, Tsub V, Herrero R, Lazcano-Ponce E, Hildesheim A, Muñoz N, Murillo R, Sánchez-Gil I and Andrus JK. **Integration of Human Papillomavirus Vaccination and Cervical Cancer Screening in Latin America and the Caribbean.** doi:10.1016/j. Vaccine.2008.05.026. 2008.

Gaiotto MAM, Julisa JF, Ribalta LC, Baracat JNSEC, Lima GR, da Silva IDCG. **Comparative study of MMP-2 (matrix metalloproteinase 2) immune expression in normal uterine cervix, intraepithelial neoplasias, and squamous cells cervical carcinoma.** American Journal of Obstetrics and Gynecology (2004) 190, 1278e82, 2004.

Gardland SM. **Can cervical cancer be eradicated by prophylactic HPV vaccination? Challenges to vaccine implementation.** Indian Journal of Medical Research 130, September 2009, pp 311-321.

Gerber S, Lane C, Brown DM, Lord W, Diloranzo M, Clements JD, Rybicki E, Williamson AL and Rose RC. **Human Papillomavirus Virus-Like Particles Are Efficient Oral Immunogens when Coadministered with *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin Mutant R192G or CpG DNA.** Journal of Virology. DOI: 10.1128/JVI.75.10.4752-4760.2001. May 2001, p. 4752-4760 Vol. 75, No. 10. 2001.

Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte I, Uhlin-Hansen L and Winberg J-O. **Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease.** Federation of European Biochemical Societies, 278 (2011) 28–45. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07920.x. 2011.

Hebner MC and Laimins LA. **Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity.** Reviews in Medical Virology, 2006; 16: 83–97. doi: 10.1002/rmv.488. 2006.

InfoPen, Sistema Prisional do Ministério da Justiça. **Relatórios estatísticos da População carcerária.** 2010. Disponível em: [HTTP:// portal.mj.gov.br/depen/data/Pages/MJS574E9CEI_TEMIDC37B2AE94C6840068B1624D28407509CPTBRNN.htm](http://portal.mj.gov.br/depen/data/Pages/MJS574E9CEI_TEMIDC37B2AE94C6840068B1624D28407509CPTBRNN.htm). Acesso em: 19/05/2010.

Instituto Nacional do Câncer. INCA. **NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL - NIC.** 2008. Disponível em: http://www.inca.gov.br/rbc/n_46/v04/pdf/normas_2.pdf. Acesso em: 05/02/2009

Intiaz MT, Distelhorsta JT, Schripsemaa JH, Sigara IM, Kasimosb JN, Lacyc SR, and Ramseya KH. **A role for matrix metalloproteinase-9 in pathogenesis of**

urogenital *Chlamydia muridarum* infection in mice. Microbes and Infection. 2007 ; 9(14-15): 1561–1566. 2007.

Ishiji T. **Molecular mechanism of carcinogenesis by human papillomavirus-16.** Tokyo. The Journal of Dermatology. (2000).27(2):73-86, 2000.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun A.J, Feuer Ej, Thun MJ. **Cancer statistics.** A Cancer Journal for Clinicians, 2009;59:225-249, 2009.

Jensen SA, Vainer B, Bartels A, Brunner N, Sorensen JB. **Expression of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) by colorectal cancer cells and adjacent stroma cells – Associations with histopathology and patients outcome.** European Journal of Cancer. doi:10.1016/j.ejca.2010.07.046. 2010.

Joste N. **Overview of the Cytology Laboratory: Specimen Processing Through Diagnosis.** MD, Obstetrics and Gynecology Clinics of North America. 35. 549–563 doi: 10.1016/ j.ogc.2008.09.003, 2008.

Jung A.C, Briolat J., Millón R., Reyniès A., Rickman D., Thomas E., Abecassis J., Clavel C and Wasylyk B. **Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma.** International Journal of Cancer: 126, 1882–1894 (2010) VC 2009 UICC.

Kanwar YS, Wada J, Lin S, Danesh F, Chugh SS, Yang Q, Banerjee T, Lomasney JW. **Update of extracellular matrix, its receptors, and cell adhesion molecules in mammalian nephrogenesis.** American Journal of Physiology - Renal Physiology 286: F202–F215, 2004;10.1152/ajprenal.00157.2004.

Kato K, Long NK, Makita H, Toida M, Yamashita T, Hatakeyama D, Hara A, Mori H, Shibata T. **Effects of green tea polyphenol on methylation status of RECK gene and cancer cell invasion in oral squamous cell carcinoma cells.** doi:10.1038/sj.bjc.6604521. British Journal of Cancer. 99, 647–654, 2008.

Korpi JT, Kervinen V, Mäkelin H, Väänänen A, Lahtinen M, Lahti E, Ristimäki A, Thomas G, Ylipalosaari M, Aho P, Lopez-Otin C, Sorsa T, Kantola S, Pirilä E, and Salo T. **Collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8) plays a protective role**

in tongue cancer. British Journal of Cancer. 98, 766–775. doi: 10.1038/sj.bjc.6604239, 2008.

Koss L.G. & Gompel C. **Introduction to Gynecologic Cytopathology with Histologic and Clinical correlation.** Lippincott Williams & Wilkins. 1a. ed. V.1, cap. 1, p: 1-6. New York. 1999.

Kucknoor A, Mundodi V, and Alderete JF. ***Trichomonas vaginalis* adherence mediates differential gene expression in human vaginal epithelial cells.** Cell Microbiology. 2005 June ; 7(6): 887–897. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00522.x. 2005.

Libra M, Scalisi A, Vella N, Clementi S, Sorio R, Stivala F, Spandidos DA, Mazzarino C. **Uterine cervical carcinoma: Role of matrix metalloproteinases (Review).** International Journal of Oncology. 34: 897-903, 2009.

Maciel GP, Tasca T, De Carli GA. **Aspectos clínicos, Patogênese e Diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 40(3):152-160. 2004.

Mathew P, Elting L, Cooksley C, Owen S, Lin J. **Cancer in an Incarcerated Population.** American Cancer Society. doi 10.1002/cncr.21468. 2005.

Marchenko GN and Strongin AY. **MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors.** Gene. 265 (2001) 87±93. PII: S0378-1119(01)00360-2. 2001.

Moody CA and Laimins LA. **Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation.** Nature Reviews. doi:10.1038/nrc2886. 2010.

Monsonégo J. **Cervical cancer prevention: the impact of HPV vaccination.** Gynecologie Obstétrique & Fertilité. 34 (2006) 189-201.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. **Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated whit cervical cancer.** New England Journal of Medicine. Lyons, France. V348 (6),p.518-27. 2003.

Murta EFC, Souza MA, Araújo Júnior E, Adad SJ. **Incidence of Gardnerella vaginalis, Candida sp and human papilloma virus in cytological smears.** São Paulo Medical Journal. 2000 Jul 6;118(4):105-8. 2000.

Nam K, Chung S, Kim J, Jeon S, Bae D. **Factors associated with HPV persistence after conization in patients with negative margins.** Journal of Gynecology and Oncology. 2009 Jun;20(2):91-5. Epub 2009 Jun 29.

Narisawa-Saito M and Kiyono T. **Mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced cervical carcinogenesis.** Nihon rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine. Tokyo. 2009.67(1):53-61, 2009.

National Cancer Institute. Human **Papillomaviruses and Cancer: Questions and Answers.** Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/risk/HPV>. Acesso em: 28/01/2009.

No J.H, Hoenil Jo, Su-Hyeong Kim, In-Ae Park, Daehee Kang, Chae Hyeong Lee, Seung-Su Han, Jae Weon Kim, Noh-Hyun Park, Soon-Beom Kang, and Yong-Sang Song. **Expression of MMP-2, MMP-9, and Urokinase-Type Plasminogen Activator in Cervical Intraepithelial Neoplasia.** Natural Compounds and Their Role in Apoptotic Cell Signaling Pathways: Ann. N.Y. Acad. Sci. 1171: 100–104, 2009.

Noda M, Oh J, Takahashi R, Kondo S, Kitayama H, Takahashi C. **RECK: A novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling.** Cancer and Metastasis Reviews 22:167-175, 2003.a

Organização Mundial da Saúde. OMS. **Departamento de Informações da OMS. Destaque da OMS.** 1990;132:1-6. 1990.

Pal S, Schmidt AP, Peterson EM, Wilson CL, de la Maza LM. **Role of matrix metalloproteinase-7 in the modulation of a Chlamydia trachomatis infection.** Immunology. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02281.x. 2005.

Papanicolaou GN. **A new procedure for staining vaginal smears.** Science. 1942 Apr 24;95(2469):438-9. 1942.

Papanicolaou GN. **The cell smear method of diagnosing cancer.** American Journal of Public Health - Nations Health. 1948 Feb;38(2):202-5. 1948.

Park HI, Nis J, Gerkemat FE, Liu D, Belozarov VE and Sang QXA. **Identification and Characterization of Human Endometase (Matrix Metalloproteinase-26) from Endometrial Tumor.** The Journal of Biological Chemistry. doi 10.1074/jbc.M002349200. Vol. 275, No. 27, Issue of July 7, pp. 20540–20544, 2000.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. **Global cancer statistics: 2002.** A Cancer Journal for Clinicians. 2005;Mar-Apr;55(2):74-108. 2005.

Pei D. **Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage.** Cell Research (1999), 9, 291-303.

Pias AA, Vargas VRA. **Avaliação dos exames citológicos de Papanicolaou com células epiteliais atípicas e respectivos exames colposcópicos com relação aos exames histopatológicos.** Revista Brasileira de Análises Clínicas, vol. 41(2): 155-160. 2009.

Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães AV. **Human Papillomavirus Prevalence among Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia III and Invasive Cervical Cancer from Goiânia, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 98(2): 181-184, March 2003 181. 2003.

Rama CH, Roteli-Martins CM, Derchain SFM, Longatoo-Filho A, Gontijo RC, Zanatta Sarian LO, Syrjänen K and Aldrich JM. **Prevalence of genital HPV infection among women screened for cervical cancer.** Revista de Saúde Pública. 2008;42(1). 2009.

Roy R, Yang J, Moses M. **Matrix Metalloproteinases As Novel Biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer.** Journal of Clinical Oncology. 1:27(31):5287-97. Epub 2009.

Sheu B.C, Huang-Chun Lien, Hong-Nereng Ho, Ho-Hsiung Lin, Song-Nan Chow, Su-Cheng Huang, and Su-Ming Hsu. **Increased expression and activation of**

Gelatinolytic Matrix Metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer. Cancer Research 63, 6537–6542, Oct, 2003.

Singer CF, Kronsteiner N, Marton E, Kubista M, Cullen KJ, Hirtenlehner K, Seifert M, and Kubista E. **MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions.** Breast Cancer Research and Treatment 72: 69–77, 2002.

Smola-Hess S, Pahne J, Mauch C, Zigrino P, Smola H and Pfister HJ. **Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in papillomavirus-positive cells: role of the human papillomavirus (HPV) 16 and HPV8 E7 gene products.** Journal of General Virology (2005), 86, 1291–1296 DOI 10.1099/vir.0.80551-0. 2005.

Snijders PJF, Steenbergen RDM, Heideman DAM, Meijer CJLM. **HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications.** The Journal of Pathology 2006; 208: 152-164. doi: 10.1002/patch. 2006.

Stori-Filho A, Pereira PC, Souza R, Pereira M, Mello I, Svidizinski and Consolaro M. **Prevalence of clue cells suggestive for *Gardnerella vaginalis* in population-based cervical screening in the public versus private health care in Maringá, Paraná, Brazil.** Archives of Gynecology and Obstetrics. doi 10.1007/s00404-040-1400-x. 2010.

Venturi BM, Cabral MG, Lourenço SC. **Oral Squamous Cell carcinoma – contribution of oncogenic virus and some molecular markers in the development and prognosis of the lesion: a review.** Revista Brasileira de Otorrinolaringologia. V.70, n.3, 385-92, mai./jun, 2004.

Visconti V, Antonilli M, Bellati F, Napoletano C, French D, Panici PB, Nuti M. **HPV induced triple neoplasms: a case report.** American Journal of Obstetrics and Gynecology. Rome, Italy. doi: 10.1016/j.ajog.2009.05.008, 2009.

Villa LL, Fernandes JV, de Vasconcellos Meissner R, Freire de Carvalho MG, de Medeiros Fernandes TAA and Medeiros de Azevedo PR. **Prevalence of HPV infection by cervical cytologic status in Brazil.** . International Journal of Gynecology and Obstetrics. Natal, Brazil. Apr;105(1):21-4, 2009.

Voog E, Bolmstedt A, Olofsson S, Ryd W, Löwhagen GB. **Human papilloma virus infection among women attending an STD clinic correlated to reason for attending, presence of clinical signs, concomitant infections and abnormal cytology.** Acta Dermato-Venereologica. 1995 Jan;75(1):75-8. 1995.

Fernandes T, de Angelo-Andrade LA, Morais SS, Pinto GA, Chagas CA, Maria-Engler SS, Zeferino LC. **Stromal cells play a role in cervical cancer progression mediated by MMP-2 protein.** European Journal of Gynaecological Oncology. 2008;29(4):341-4.

Zeferino LC and Derchain SF. **Cervical cancer in the developing world.** Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology. São Paulo. vol. 20, No. 3, pp. 339-354, doi:10.1016/j.bpobgyn.2006.01.018.

Zhou CY, Yao JF, Chen XD. **Expression of matrix metalloproteinase-2, 9 and their inhibitor-TIMP 1,2 in human squamous cell carcinoma of uterine cervix.** Ai Zheng. Hangzhou, China. Jul;21(7):735-9, 2002.

zur Hausen H. **Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application.** Nature. doi:10.1038/nrc798. 2002.

zur Hausen H. **Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account.** Virology. Heidelberg. Feb 20;384(2):260-5, 2009.

ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa

Ofício CEP/FCF/107/2010

São Paulo, 28 de setembro de 2010.

Ilmo(a). Sr(a).
Erika Regina Matheus
Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler

Senhor(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em de 26/07/2010, tomou ciência do Parecer Consubstanciado aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo, da emenda (versão 1 de 05/03/2010) sob o título "Prevalência da infecção pelo HPV em esfregaços cérvico-vaginais e orais e sua relação com a expressão da metaloproteinase de matriz do tipo 9: um estudo citopatológico.", apresentado por Vossa Senhoria.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Mariza Landgraf
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

ANEXO B

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 10 de junho de 2010
CEP 0369/06
CONEP

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) MARCO ANTONIO ZONTA
Disciplina/Departamento: Infectologia/Medicina da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

PARECER CONSUBSTANCIADO

Ref: **EMENDA (VERSÃO 1 DE 05/MAR/2010)** do projeto de pesquisa intitulado: **"Prevalência da infecção genital e oral pelo papilomavírus humano (HPV) em mulheres do presídio feminino da cidade São Paulo"**.

Prezado(a) Pesquisador(a),

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo em 20/03/2010, obtendo sua aprovação final 07/04/2006. O presente estudo apresentou como objetivo verificar, através dos métodos de citologia e moleculares, a prevalência da infecção genital e oral pelo Papilomavirus humano em mulheres internas do Presídio Feminino da Cidade de São Paulo. A metodologia apresentada contemplava o estudo de 650 amostras cérvico-vaginais e da orofaringe de mulheres na faixa etária de 18 a 60 anos, com vida sexual ativa, internadas no Presídio Feminino da cidade de São Paulo. As pacientes foram submetidas a uma anamnese prévia, o material cérvico-vaginal e de oro faringe foi colhido pelo método convencional. Parte do material foi submetido à técnica de preparo em base líquida (Papanicolaou) e o restante destinado às técnicas moleculares de captura híbrida e PCR. As análises citopatológicas foram submetidas à coloração de Papanicolaou e realizadas no setor de citopatologia do Laboratório de Biomedicina São Leopoldo. As técnicas moleculares segundo a proposta do investigador, seriam realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Doenças Infecto-Contagiosas e Parasitárias da UNIFESP e Biologia Molecular da UNIBAN. Para detecção de HPV, foram realizadas reação de PCR e RFLP para tipagem do HPV de alto e baixo risco. Os produtos de PCR positivos para HPV foram sequenciados e comparados com as do Genbank. O protocolo de estudo não apresentou risco para os sujeitos de pesquisa envolvidos, embora houvesse um desconforto leve decorrente da coleta de material cérvico vaginal e oral. Em 05/03/2010 o pesquisador principal submeteu para análise do CEP a emenda (versão nº 1 de 05/mar/2010). A proposta de emenda foi dar continuidade ao trabalho através de parceria com a Profa. Dra. Silvyia Stuchi Maria-Engler e da aluna Erika Regina Matheus, responsáveis pelo estudo intitulado "Prevalência da infecção pelo HPV em esfregaços cérvico-vaginais e orais e sua relação com a expressão da metaloproteínase de matriz do tipo 9: um estudo citopatológico", da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em conjunto com o

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

departamento de Patologia. A emenda consiste na verificação da expressão de metaloproteinases (MMPs) de matriz em amostras cruzadas HPV positivas de cérvix-vaginal e orofaringe, o qual implicará em estudo molecular, citopatológico e imunocitoquímico das amostras coletadas e reavaliadas das internas do presídio de São Paulo e a inclusão de uma nova metodologia de estudo imunocitoquímico. Assim como o estudo principal, esta nova fase não apresenta risco às participantes, apresentando apenas um leve desconforto ocasionado pela coleta de material. Segundo o pesquisador principal os resultados obtidos com a análise do material serão encaminhados ao serviço de saúde da instituição para devidas providências cabíveis.

STATUS DA EMENDA (Versão 1 de 05/Mar/2010): **APROVADO**

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo