



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA

FLÁVIA DE CASTRO SANTANA

**AVALIAÇÃO DO PAPEL PROGNÓSTICO DO BIOMARCADOR VIMENTINA NO
CÂNCER DE COLO UTERINO**

Goiânia

2018

FLÁVIA DE CASTRO SANTANA

**AVALIAÇÃO DO PAPEL PROGNÓSTICO DO BIOMARCADOR VIMENTINA NO
CÂNCER DE COLO UTERINO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado em Genética da Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Genética.

Orientadora: Vera Aparecida Saddi

Co-orientadora: Silvia Helena Rabelo

Goiânia

2018

S232a Santana, Flávia de Castro

Avaliação do papel prognóstico do biomarcador vimentina no câncer de colo uterino [recurso eletrônico] / Flávia de Castro Santana.-- 2018.

65 f.; il.;

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Genética, Goiânia, 2018.

Inclui referências f. 50-58

1. Colo uterino - câncer. 2. Colo uterino - Prognóstico. 3. Imuno-histoquímica - Saúde - Brasil. I.Saddi, Vera Aparecida. II.Rabelo dos Santos, Silvia Helena. III.Pontifícia Universidade Católica de Goiás. IV. Título.

CDU: Ed. 2007 -- 618.14-006(043)



**PUC
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 ● Setor Universitário
Caixa Postal 86 ● CEP 74605-010
Goiânia ● Goiás ● Brasil
Fone: (62) 3946.1070 ● Fax: (62) 3946.1070
www.pucgoias.edu.br ● prope@pucgoias.edu.br

ATA COMPLEMENTAR Nº 143/2018


MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

DISCENTE: FLÁVIA DE CASTRO SANTANA


Defendida em 13 de agosto de 2018 e APROVADA COM CONCEITO.....B

O título foi alterado () não () sim _____

BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi
PUC Goiás (Presidente)


Profa. Dra. Flávia Melo Rodrigues
PUC Goiás


Profa. Dra. Megmar Aparecida Carneiro
Membro externo/UFG

Aos meus pais, sem os quais a minha existência não seria possível.
Aos meus mestres, desde a minha primeira professora, Ivete, a todos os gigantes que me inspiraram na busca constante de aprender e, em especial, à minha orientadora, professora Vera Saddi, brilhante pesquisadora, excelente professora do saber e da vida.

“Se hoje vejo longe, é porque subi nos ombros dos gigantes”.

(Isaac Newton)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Walter e aos meus filhos, Vitor, Bruna e Lara, pelo estímulo e pela paciência.

Agradeço a todos os professores do mestrado, especialmente à professora Flávia Melo.

Agradeço a todos os colegas do mestrado, que sempre me incentivaram e, principalmente, à Andreyra, Thaís e Jéssica, meus “anjos da guarda”.

Agradeço ao Ricardo, que sempre esteve disponível no laboratório para colaborar com esta pesquisa.

Agradeço também aos meus irmãos, amigos e alunos, que me animam sempre a seguir em frente.

Agradeço aos pacientes, objetivo maior da busca de conhecimento.

“Ao tomar a ação, recebo algo de presente”.

(Bert Hellinger)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Câncer de Colo Uterino.....	3
2.2 Epidemiologia e Fatores de Risco no Câncer de Colo Uterino.....	5
2.3 HPV e Carcinogênese	7
2.4 Fatores Prognósticos para o Câncer de Colo Uterino.....	12
2.6 Prevenção do Câncer de Colo Uterino.....	15
2.7 Tratamento do Câncer de Colo Uterino.....	17
2.8 Transição Epitélio-Mesênquima	18
2.9 Vimentina	24
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
4 METODOLOGIA.....	33
4.1 Aspectos Éticos da Pesquisa	33
4.2 Tipo de Estudo e Casuística.....	33
4.3 Análise Imuno-histoquímica no Câncer de Colo Uterino	34
4.4 Análise Estatística.....	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Grupo de estudo – aspectos sociodemográficos e clinicopatológicos	37
5.2 Expressão de Vimentina.....	38
5.3 Aspectos Prognósticos e Sobrevida	39
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÕES.....	49

8 REFERÊNCIAS	50
ANEXO A.....	59
ANEXO B.....	63

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TABELAS

Tabela 1. Classificação dos tumores quanto à definição de tumor primário do câncer de colo uterino	13
Tabela 2. Classificação dos tumores quanto ao comprometimento linfonodal e quanto à presença de metástases	15
Tabela 3. Interação da Vimentina com proteínas e função celular	26
Tabela 4. Alguns sítios de fosforilação da Vimentina por quinases	28
Tabela 5. Informação sobre os anticorpos	34
Tabela 6. Características sociodemográficas e clinicopatológicas das pacientes com câncer de colo uterino	37
Tabela 7. Expressão de Vimentina em relação às características clinicopatológicas dos carcinomas de colo uterino.....	39

FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do útero e estrutura do epitélio normal da ectocérvice	3
Figura 2. Representação do epitélio colunar da endocérvice.....	4
Figura 3. Descrição do epitélio do colo uterino e ilustração da junção escamo-colunar entre os epitélios colunar e epitélio estratificado pavimentoso	5
Figura 4. Organização genômica do HPV	9
Figura 5. Representação da carcinogênese pelo HPV	10
Figura 6. Representação histológica das lesões intraepiteliais cervicais (NIC).....	12
Figura 7. No programa TEM ocorre mudança do fenótipo epitelial para o fenótipo mesenquimal. Os genes das famílias SNAIL, ZEB e, TWIST expressam os fatores de transcrição específicos do programa TEM, snail, zeb e twist.	19
Figura 8. Transição epitélio-mesênquima e transição mesênquima- epitelial. Modificação do fenótipo epitelial para o fenótipo mesenquimal e de um fenótipo mesenquimal para o fenótipo epitelial	19
Figura 9. Plasticidade através dos estágios de transição durante o processo de TEM e TME.....	21
Figura 10. Etapas de angiogênese na vascularização tumoral	23
Figura 11. Etapas do processo metastático	24
Figura 12. Localização cromossômica do gene 10p13C	25
Figura 13. Estrutura do monômero de Vimentina.	25
Figura 14. O papel da Vimentina no câncer	30
Figura 15. Fluxograma do total de amostras incluídas no estudo.....	34
Figura 16. Imunoexpressão de Vimentina em células de melanoma humano	35
Figura 17. <i>Score</i> de expressão da Vimentina $\leq 40\%$. (A) Carcinoma escamoso. (B) Adenocarcinoma	36
Figura 18. <i>Score</i> de expressão da Vimentina $\geq 40\%$. (A) Carcinoma Escamoso. (B) Adenocarcinoma.....	36
Figura 19. Sobrevida global para as pacientes estudadas com câncer de colo uterino	39
Figura 20. Sobrevida em cinco anos para as pacientes com câncer de colo uterino em função da idade.....	40

Figura 21. Sobrevida em cinco anos para as pacientes com câncer de colo uterino em função do tipo histológico	40
Figura 22. Sobrevida em cinco anos para as pacientes com câncer de colo uterino em função da extensão da lesão.....	41
Figura 23. Sobrevida em cinco anos para as pacientes com câncer de colo uterino em função da presença de metástase linfonodal	41
Figura 24. Sobrevida em cinco anos para as pacientes com carcinoma de colo uterino em função da presença de metástase à distância.....	42
Figura 25. Sobrevida em cinco anos para as pacientes com carcinoma de colo uterino em função do estadiamento TNM	42
Figura 26. Sobrevida em cinco anos para as pacientes com carcinoma de colo uterino em função da expressão de Vimentina	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACCG	Associação de Combate ao Câncer em Goiás
ACO	Anticoncepcionais orais
AJCC	<i>American Joint Committee on Câncer</i>
AKT1	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
AXL	<i>Receptor tirosine kinase AXL</i>
ATF4	Fator ativador da transcrição 4
CAMkII	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II</i>
cGMPK	proteína quinase dependente de cGMP
Cdk-1	<i>Cyclin-dependent kinase 1</i>
CTC	Células tronco tumorais
CYP2D6	Enzima detoxificante citocromo fase I
DAB	diaminobenzidina
DDL4	<i>delta like canonical notch ligand 4</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Genes precoces do HPV
EGFR	Receptor do fator de crescimento da epiderme
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
E1	Proteína viral E1 do HPV
E2	Proteína viral E2 do HPV
E2F	Grupo de genes que codificam uma família de fatores de transcrição (TF)
E4	Proteína viral E4 do HPV
E3	Ubiquitina ligase
E5	Proteína viral E5 do HPV
E6	Proteína viral E6 do HPV
(E6-AP)	Proteína associada à E6
E7	Proteína viral E7 do HPV
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FIs	Filamentos intermediários
FIGO	<i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i>
FN	Fibronectina
FTs-TEM	Fatores de Transcrição de transição epitélio-mesênquima
HIF	Fator indutor da hipóxia I
hnRNP	Proteínas ribonucleicas nucleares heterogêneas
HPV	Papilomavírus humano
IgE	Imunoglobulina E
IGF-1	Fator de crescimento insulina-1
IHQ	imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ILV	Invasão linfovascular
IST	Infecção sexualmente transmissível
KM	Kaplan-Meier
L	Genes tardios do HPV
LR	Baixo risco oncogênico
LCR	<i>Long control region</i>
YESK	<i>Tyrosine-protein kinase</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinases</i>
MMP	Metaloproteínas
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NIC 1	Neoplasia intraepitelial grau 1
NIC 2	Neoplasia intraepitelial grau 2
NIC 3	Neoplasia intraepitelial grau 3
NK	<i>Natural killer</i>
ORF	<i>Open reading frames</i>
PAK	p21-quinase ativada
PBS	tampão fosfato

PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial hidrogênioiônico
PP2A	Proteína fosfatase 2A
PK	Proteína quinase
PKA	Proteína quinase A
PKB	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase C
pRB	Proteína retinoblastoma
p53	Proteína supressora de tumor
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results Program</i>
Scrib	<i>Protein scribble homolog</i>
SNAIL	<i>Family of zinc-finger transcription factors</i>
SLUG	também conhecido por SNAIL2 (membro da família SNAIL)
TGF β	Fator de crescimento transformador beta
TEM	Transição epitélio-mesênquima
TME	Transição mesênquima-epitélio
TWIST	<i>TWIST family BHLH transcription factor</i>
URR	<i>Upstream regulatory region</i>
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VIM	Gene que codifica a proteína Vimentina
Wnt/ β -	Via de sinalização <i>Wnt</i> / β -catenina
ZEB1	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox 1</i>
ZT	Zona de transformação cervical
14-3-3	<i>14-3-3-like protein B</i>

RESUMO

O câncer de colo uterino é uma doença frequente nos países em desenvolvimento e, no Brasil, é considerado um grave problema de saúde pública. Um evento denominado transição epitélio-mesênquima (TEM) vem sendo estudado nos cânceres humanos, pois a sua reativação interfere nos processos de invasão e metástase. A TEM envolve complexas alterações da expressão gênica de vários biomarcadores, dentre eles a Vimentina. O objetivo deste estudo consistiu em avaliar a expressão da Vimentina no câncer do colo uterino investigando o papel prognóstico desse biomarcador. Essa avaliação foi realizada por imuno-histoquímica em 111 casos de câncer de colo uterino e o índice de marcação foi avaliado em relação aos aspectos clínico-patológicos e à sobrevida. Os resultados demonstraram que a expressão aberrante de Vimentina foi observada em 100% dos espécimes tumorais avaliados. A hiperexpressão desse biomarcador considerada (>40%) foi observada em 28 casos (25,2%), entretanto, não foi associada aos aspectos clínico-patológicos e prognósticos do câncer de colo uterino. A sobrevida global para o grupo de pacientes estudado foi de 65,8% e foi influenciada por idade, tamanho do tumor, presença de metástases linfonodais, presença de metástases à distância e estadiamento clínico. Com base nos resultados aqui obtidos, a hiperexpressão de Vimentina não foi considerada um fator prognóstico para o câncer de colo uterino.

Palavras-chave: Imuno-histoquímica. Sobrevida. Transição epitélio-mesenquima. Vimentina.

ABSTRACT

Cervical cancer is a common disease in developing countries and in Brazil it is considered a serious public health problem, since diagnosis is still performed in late stages of the disease. An event called epithelial-mesenchymal transition (EMT) is important in tumor progression, since it interferes in the process of invasion and metastasis. EMT has been frequently studied in human cancers. Aberrant expression of several biomarkers is often observed in the EMT process, including the expression of Vimentin. The aim of this study was to evaluate the expression of Vimentin in cervical carcinomas investigating the prognostic role of this biomarker. Vimentin expression was evaluated by immunohistochemistry in 111 cases of cervical carcinomas and levels of expression were evaluated in relation to clinic pathological and prognostic aspects of the tumors. According to the results, aberrant expression of Vimentin was observed in 100% of the carcinomas. Vimentin overexpression (> 40%) was observed in 28 cases (25.2%), however, it was not associated with clinic pathological aspects and prognosis of cervical carcinomas. The overall survival for the group was 65.8% and it was influenced by age, the size of the tumor, the presence of lymph node metastasis, the presence of distant metastasis and by clinical staging. However, it was not influenced by Vimentin expression. Based on the results obtained in this study, the Vimentin expression was not considered a prognostic factor for cervical carcinomas.

Keywords: Cervical cancer. Epithelial-mesenchymal transition. Immunohystokemistry. Survival. Vimentin.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino é um dos cânceres mais comuns. São esperados, anualmente, 528 mil novos casos, com uma taxa de incidência de 14/100 mil mulheres e 266 mil mortes (INCA, 2018). Esse é um tipo de câncer controlável quando detectado em fase inicial, realidade não observada em países em desenvolvimento. Essa disparidade entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento deve-se à falta de recursos e informações para o diagnóstico precoce de câncer, o que consiste em um grave problema de saúde pública nas sociedades globais (INCA, 2018).

O principal fator de risco para o câncer de colo uterino é o papilomavírus humano (HPV) de alto risco, descrito como fator necessário, mas não suficiente para induzir a tumorigênese cervical (DOORBAR, 2006). Fatores como tabagismo, etilismo e infecções sexualmente transmissíveis estão implicados no mecanismo da carcinogênese cervical (HUSAIN; RAMAKRISHNAN, 2015).

Na infecção persistente por vírus oncogênicos, a expressão das oncoproteínas virais leva à promoção de alterações de proteínas supressoras tumorais como a p53 e a proteína retinoblastoma (pRb), alterando o ciclo celular e modificando uma série de vias de sinalização, favorecendo o crescimento tumoral. Com a progressão da doença, as células tumorais rompem a membrana basal, caracterizando a invasão da doença, a qual pode progredir para metástases, que consistem na evasão das células tumorais do sítio primário em direção a locais distantes (HUSAIN et al., 2016; MCCLOSKEY et al., 2010; MONSONEGO et al., 2011; RIDGE et al., 2016).

Nesse processo de progressão tumoral há a reativação de um complexo programa biológico, denominado transição epitélio-mesenquima, que ocorre durante a embriogênese e em processos de reparação tissular. Uma característica dessa reprogramação é a alteração da expressão gênica no intuito de aumentar o potencial invasor das células tumorais com diminuição da adesão celular, perda da polaridade, ganho da habilidade para invasão e migração, promovendo movimentos morfogênicos que incluem rearranjos no citoesqueleto da célula tumoral (HUSAIN et al., 2016). Dentre as proteínas envolvidas nesse programa biológico, a Vimentina, pertencente à família dos filamentos intermediários, do citoesqueleto, apresenta um importante papel como marcador da TEM, pois as células epiteliais adquirem um fenótipo mesenquimal com alteração da sua forma e ganho de motilidade por sua expressão aberrante (BRABLETZ et al., 2018; LEE et al., 2012). A TEM é caracterizada pela expressão

de Vimentina em células epiteliais, que normalmente expressam somente filamentos de queratina (SITOLE; MAVRI-DAMELIN, 2018).

Durante as últimas décadas ocorreram diversos avanços nas pesquisas sobre a carcinogênese em vários tumores, no entanto, ainda há necessidade de ampliar o conhecimento sobre o mecanismo de progressão e metástase do câncer de colo uterino. Existem vários estudos que avaliaram biomarcadores que estão envolvidos no diagnóstico do câncer, porém, os biomarcadores de filamentos intermediários, os quais compõem o citoesqueleto celular, ainda são pouco estudados (HUSAIN et al., 2016; YU et al., 2015).

Biomarcadores são moléculas de ocorrência natural pelas quais determinado processo patológico pode ser identificado ou monitorado (MIKESKA; BOCK, 2012). Um biomarcador ideal deve ser capaz de fornecer informações clinicamente relevantes, ser precisamente mensurável em vários indivíduos e em várias populações (MIKESKA; BOCK, 2012; OGINO et al., 2013).

A Vimentina tem sido associada ao desenvolvimento e à progressão de vários tipos de câncer (FIGIEL et al., 2017; YAMASHITA et al., 2013), tendo sido sua expressão relacionada ao aumento do crescimento tumoral, invasão e pior prognóstico (HUSAIN et al., 2016).

Este estudo avaliou a expressão da Vimentina em câncer de colo uterino, buscando estabelecer a possível associação desse marcador com os aspectos clínico-patológicos e o prognóstico dessa doença.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer de Colo Uterino

O útero é um órgão muscular que se localiza na cavidade pélvica e apresenta duas partes básicas: o corpo e o colo. O colo do útero tem formato cilíndrico e projeta-se para a vagina como uma porção extra-abdominal. O colo do útero relaciona-se anteriormente com a bexiga, posteriormente com o reto e superiormente com o corpo uterino. Ao projetar-se na vagina, forma o fundo de saco anterior, posterior, lateral direito e esquerdo. Sua posição estática na pelve é mantida por meio dos ligamentos. A drenagem linfática é realizada para as cadeias ilíacas internas, ilíacas externas e ilíacas comuns (HALL; GUYTON, 2011).

O colo do útero é revestido por várias camadas de células epiteliais pavimentosas. O revestimento externo, denominado ectocérvice, apresenta o epitélio escamoso estratificado não queratinizado. O epitélio estratificado do colo uterino pode ser dividido em três camadas: superficial, intermediária e basal. As células basais ou células de transição possuem uma vida útil limitada e apresentam uma alta atividade de divisão celular (BODILY; LAIMINS, 2011). As células basais se dividem e maturam para formar as próximas camadas, chamadas de células parabasais. A diferenciação e maturação dessas células conduz às camadas intermediárias. Com mais maturação, são formadas células grandes e acentuadamente planas. Da camada basal à superficial, as células sofrem um aumento de tamanho e redução do tamanho nuclear (Figura 1) (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2003).

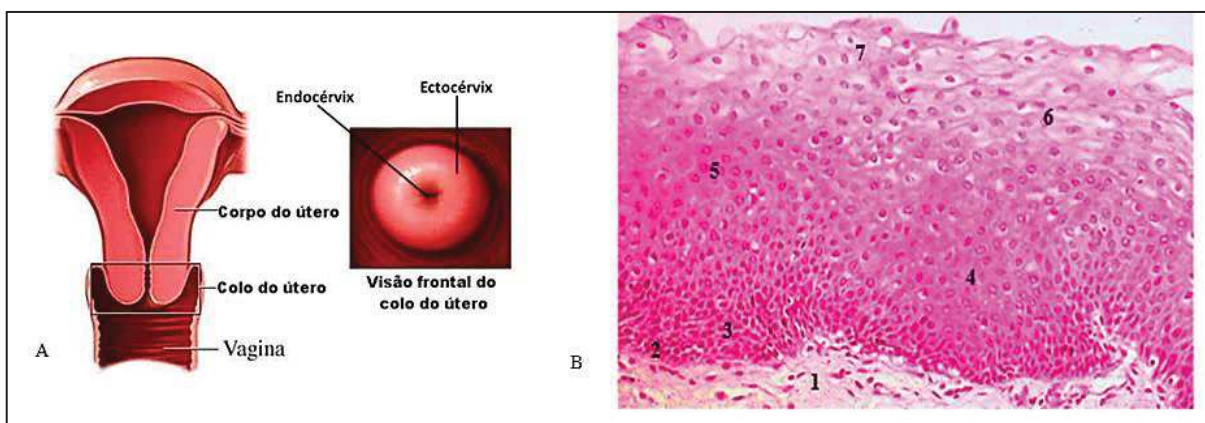


Figura 1. Representação esquemática do útero e estrutura do epitélio normal da ectocérvice

A) Representação esquemática do útero e estrutura do epitélio normal da ectocérvice. O útero apresenta o colo do útero, também conhecido como cérvix. Ao lado, temos o colo do útero representado frontalmente, apontando as estruturas endocérvice e ectocérvice. B) Estrutura do epitélio normal da ectocérvice: 1: tecido conjuntivo, 2: membrana basal, 3: células basais, 4: células parabasais, 5: células intermediárias, 6: células superficiais e 7: células esfoliantes.

Fonte: Adaptado de Laboratório de Patologia Virtual (2017).

O revestimento interno da endocérvice é composto por células colunares, que caracterizam o epitélio colunar ou glandular (Figura 2). O epitélio glandular apresenta uma única camada de células colunares altas, com núcleos de coloração escura, próxima à membrana basal e recobre uma extensão variável da ectocérvice. Essa variação depende da idade, do estado reprodutivo e do estado hormonal (SANKARANARAYANAN et al., 2005). O epitélio colunar é direcionado para dentro das pregas longitudinais que se projetam na luz do canal para formar projeções papilares. Há a formação de várias invaginações na matriz do estroma cervical, o que resulta na formação de criptas endocervicais (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2003).

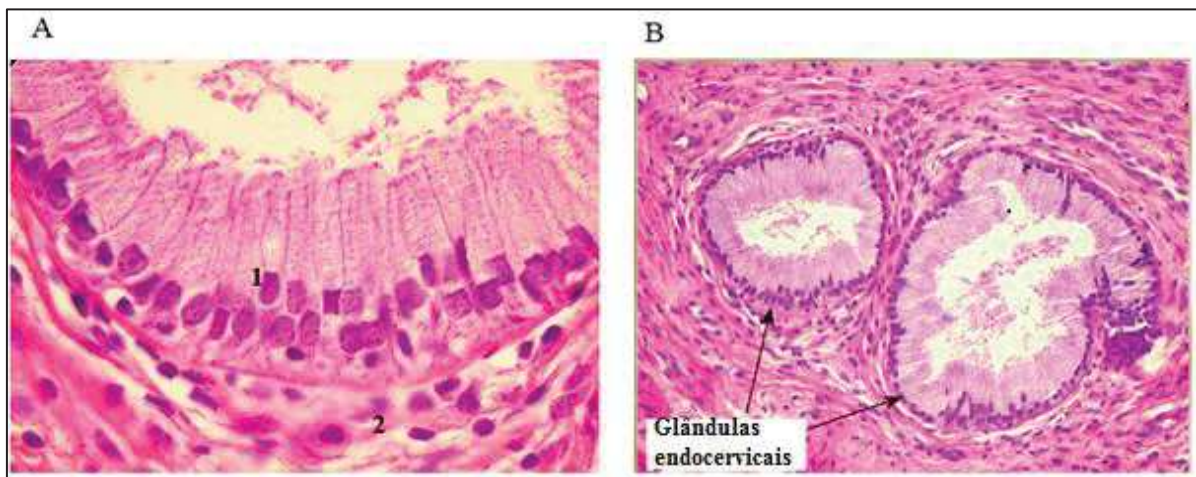


Figura 2. Representação do epitélio colunar da endocérvice

A) Representação do epitélio colunar da endocérvice. 1: Epitélio cilíndrico simples mucoso. 2: Localização do estroma. B) O Epitélio colunar forma várias invaginações na matriz do estroma cervical, resultando na formação de criptas endocervicais.

Fonte: Adaptado do Atlas de Anatomia Patológica (2016).

O colo do útero apresenta um local de encontro dos epitélios escamoso (ectocérvice) e glandular (endocérvice), que se denomina zona de transformação cervical, a qual desempenha um importante papel na carcinogênese e é vista como um anel bidimensional de epitélio, uma área susceptível à ação do HPV (Figura 3) (HERFS et al., 2012).

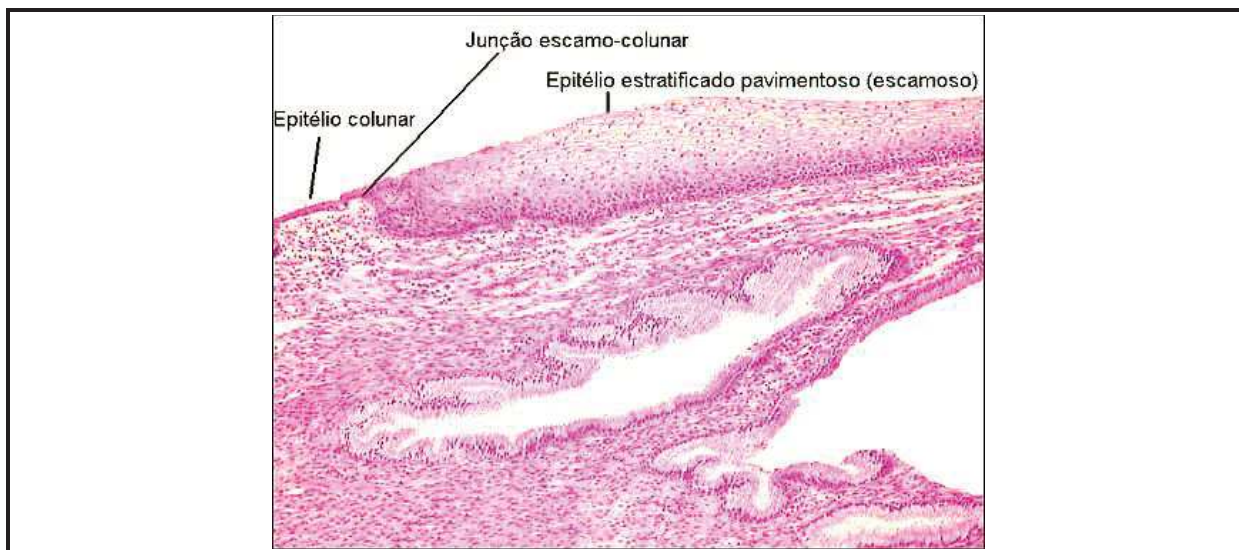


Figura 3. Descrição do epitélio do colo uterino e ilustração da junção escamo-colunar entre os epitélios colunar e epitélio estratificado pavimentoso

Fonte: Adaptado de Atlas de Anatomia Patológica (2016).

O câncer de colo uterino é caracterizado pela replicação desordenada das células do epitélio do órgão, compromete o tecido subjacente (estroma) e pode invadir estruturas e órgãos contíguos ou à distância (INCA, 2011).

Em relação aos tipos histológicos, o câncer de colo uterino é classificado em três tipos principais: carcinomas escamosos, adenocarcinomas e carcinomas adenoescamosos (IARC, 2018). O carcinoma escamoso é o tipo histológico mais frequente e corresponde a cerca de 75% dos casos, seguido pelo adenocarcinoma, com cerca de 25% dos casos, e pelo carcinoma adenoescamoso, com 3 a 5% dos casos. Outros tipos mais raros também podem ocorrer e incluem carcinoma neuroendócrino de pequenas células, carcinoma adenoide cístico, sarcoma e linfoma (IARC, 2018).

2.2 Epidemiologia e Fatores de Risco no Câncer de Colo Uterino

O câncer de colo uterino acomete mulheres em todo o mundo e é o segundo dentre os cânceres ginecológicos. A faixa etária mais comprometida corresponde a mulheres entre 45 e 50 anos. As taxas de incidência do câncer de colo uterino variam nas diversas regiões do planeta e são mais elevadas em países em desenvolvimento (IARC, 2012). As estimativas variam de 15,7/100 mil habitantes, nos países em desenvolvimento, e 9,9/100mil habitantes, nas regiões mais desenvolvidas (INCA, 2017).

Em relação à taxa de mortalidade, há uma grande variação nas diversas regiões, que oscila de 2/100 mil habitantes, em regiões como Europa Ocidental, Ásia Ocidental, Austrália e

Nova Zelândia, a 20/100 mil habitantes em países como Malásia e África Subsariana (IARC, 2012; VACCARELLA et al., 2017). Um fato a ser considerado sobre essa distribuição heterogênea do câncer de colo uterino são as estratégias de enfrentamento estabelecidas nos países mais desenvolvidos, como a introdução do exame de Papanicolaou, nos anos 1950, e 1960, com a diminuição da incidência de mortalidade por essa doença. Um exemplo é os Estados Unidos da América (EUA), que por meio de um programa organizado de rastreamento alcançou uma cobertura de 83%, comparado com valores de 6 a 8% obtidos em países em desenvolvimento (IDOWU et al., 2016; MUSA et al., 2016). Dados do programa *Surveillance, Epidemiology and End Results Program* (SEER) mostraram que, para 2018, foram estimados cerca de 13.240 novos casos, correspondendo a 0,8% de todos os casos de câncer, com um número estimado de 4.170 casos de mortes (SEER, 2018).

No Brasil, estima-se, para o biênio de 2018-2019, aproximadamente 16.370 novos casos de câncer de colo uterino, com um risco estimado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2018). A distribuição é heterogênea nas diversas regiões brasileiras. Na região Norte, o câncer de colo uterino é mais frequente (25,62/100 mil habitantes), seguido pela região Nordeste (20,47/100 mil habitantes), Centro-Oeste (18,32/100 mil habitantes), Sul (14,07/100 mil habitantes) e Sudeste (9,97/100 mil habitantes). Na região Centro-Oeste foram estimados, para o ano de 2018, 1.490 novos casos e, nas capitais, cerca de 300 novos casos de câncer de colo uterino (INCA, 2017). No estado de Goiás, são 580 novos prováveis casos desse tipo de câncer, com uma taxa bruta de 16,78% e, em Goiânia, 140 novos casos, correspondentes à taxa bruta de 17,59% casos da doença (INCA, 2017).

Em relação aos fatores de risco para o câncer de colo uterino, a infecção pelo HPV de alto risco é considerada como o principal fator, no entanto, uma causa única não é suficiente para estabelecer o câncer de colo uterino (MUÑOZ et al., 2006). Alguns cofatores que influenciam na carcinogênese incluem infecções sexualmente transmissíveis, múltiplos parceiros sexuais, início precoce da atividade sexual, múltiparas, tabagismo, uso de anticoncepcionais orais e carências nutricionais (AMORIM et al., 2017).

O tabagismo influencia a carcinogênese no câncer de colo uterino e fatores como tempo de exposição, idade de início, período e frequência do consumo de cigarros parecem influenciar a incidência dessa doença (MILESHKIN et al., 2014). Os mecanismos que contribuem na oncogênese viral incluem a exposição direta do DNA celular à nicotina e à cotidina, além de metabólitos da fumaça do cigarro (MILESHKIN et al., 2014). Outro mecanismo que relaciona o tabagismo à carcinogênese é a imunossupressão causada no sistema imune periférico de

pacientes fumantes, com o aumento do número de linfócitos T citotóxicos, diminuição do número de linfócitos T indutores, diminuição das células *natural-killer* e nível baixo das imunoglobulinas, exceto a IgE. No colo uterino das mulheres fumantes há diminuição de células de Langherhans (ROURA et al., 2014).

O uso prologando de anticoncepcionais orais está associado ao câncer de colo uterino. O risco aumenta 2,8 vezes com uso entre 5 e 9 anos e 4 vezes mais após dez anos de uso em relação a não usuárias (SMITH et al., 2011).

Fatores comportamentais como a idade do primeiro intercuro sexual, o número de parceiros e o comportamento sexual do parceiro estão associados com o aumento do risco de infecção por HPV. Mulheres que iniciam intercuro sexual antes dos 16 anos são mais vulneráveis à infecção pelo HPV, mais susceptíveis à ectopia da zona de transformação e susceptíveis à persistência da infecção viral (ALMONTE et al., 2011; GININDZA et al., 2017).

O vírus da imunodeficiência humana é um importante fator de risco no câncer de colo uterino, mostrando um impacto desfavorável por estar associado a um aumento da possibilidade de adquirir o HPV e a um maior risco de persistência viral (CLIFFORD; TULLY; FRANCESCHI, 2017). O HIV e o HPV apresentam fatores virais que atuam no hospedeiro e em seu sistema imune, o que o leva ao aumento do risco de morbidade e mortalidade (CLIFFORD et al., 2006).

A inflamação cervical, causada por agentes como *Chlamydia trachomatis* e *Herpes simplex*, além da infecção intracelular por *Mycoplasma genitalium*, pode estar associada a lesões de alto grau e ser um cofator para lesões cervicais de alto grau em mulheres que foram infectadas por genótipos oncogênicos de HPV, expondo o tecido a danos constantes. Isso pode contribuir para a persistência e a progressão da doença viral e, assim, aumentar o potencial de carcinogênese (AMORIM et al., 2017; YE et al., 2018; ZHU et al., 2016).

2.3 HPV e Carcinogênese

O câncer forma-se quando as células perdem o controle do seu crescimento e diferenciação, alterando o ciclo celular e levando à carcinogênese (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEIMBERG, 2017). O mecanismo envolvido na carcinogênese do câncer de colo uterino tem como agente etiológico central a infecção persistente do HPV de alto risco (SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013).

O HPV pertence à família *Papillomaviridae* e está presente em aproximadamente 99,7% dos casos de câncer de colo uterino (DOORBAR et al., 2012; KING et al., 2018). É um vírus não envelopado de aproximadamente 55 nm de diâmetro, de simetria icosaédrica, cujo capsídeo é formado por 72 capsômeros, que envolvem um genoma composto por DNA de fita dupla circular, com cerca de 8.000 pares de bases (DOORBAR; EGAWA; GRIFFIN, 2015; MUÑOZ et al., 2006).

Os tipos de HPV são definidos com base nas sequências nucleotídicas dos genes da região L1 e sua posição dentro das árvores filogenéticas de seu genoma. São conhecidos mais de 200 tipos, distribuídos em cinco gêneros: *Alfa-papilomavirus*, *Mu-papilomavirus*, *Nu-papilomavirus*, *Gama-papilomavirus* e *Beta-papilomavirus* (DOORBAR et al., 2012; EGAWA; DOORBAR, 2017).

As espécies ou grupos mais importantes relacionados ao câncer de colo uterino são os *Alpha-papillomavirus*. Genótipos específicos de HPV determinam diferentes riscos para a persistência e a progressão da neoplasia cervical (BRAWNER et al., 2013; EGAWA; DOORBAR, 2017). Os HPV 16 e 18 são os genótipos mais importantes relacionados ao câncer. O HPV 16 responde por aproximadamente 60% dos casos de câncer de colo uterino e o HPV 18 é responsável por cerca de 15% deles (DOORBAR et al., 2012). Os HPV de alto risco incluem genótipos como: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 (DOORBAR et al., 2012).

O genoma do HPV é constituído por aproximadamente oito regiões de leitura aberta – *open reading frames* (ORF) – compostas por pelo menos seis genes expressos precocemente e dois genes expressos tardiamente, denominados, respectivamente, de genes precoces (E) e genes tardios (L) (MUÑOZ et al., 2006). Entre L1 e E6 o genoma possui uma região reguladora intitulada *Long control region* (LCR) ou *Upstream regulatory region* (URR), que contém as sequências de controle para a replicação e a expressão gênica do HPV (Figura 4) (DOORBAR et al., 2012; PERALTA et al., 2013).

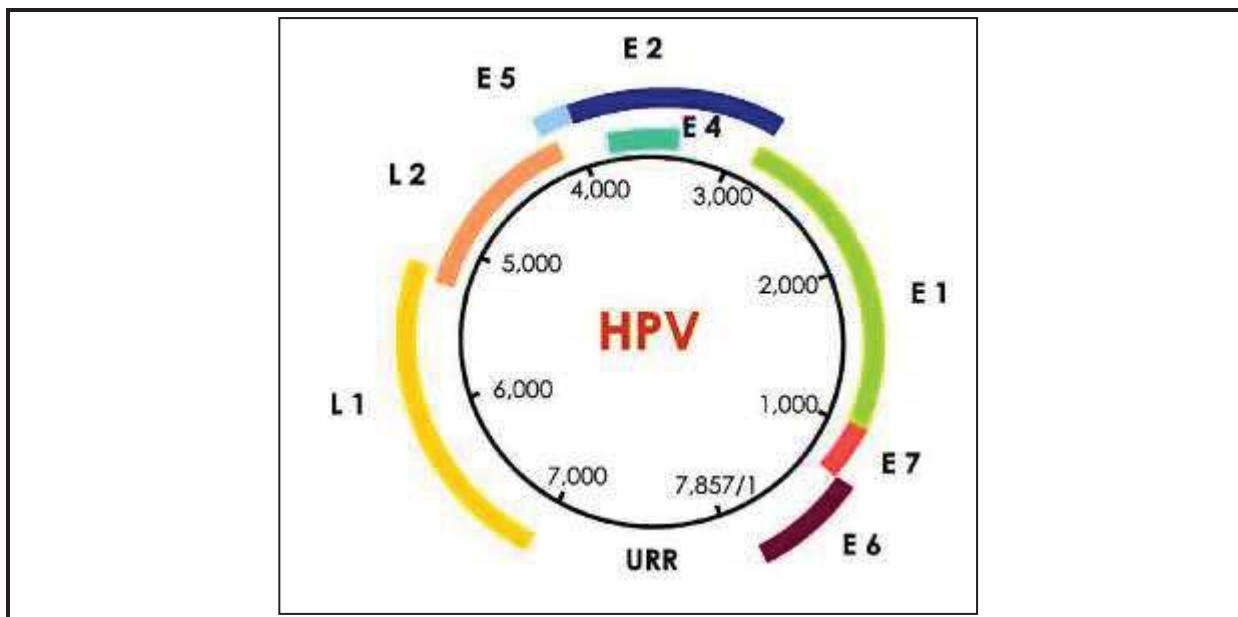


Figura 4. Organização genômica do HPV

Fonte: Muñoz et al. (2006).

A região precoce é formada pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Dentre eles, E1 tem relação com a replicação viral e com a atividade de ATPase e helicase; E2 está associado com a transcrição e a replicação; E4 com a maturação viral, alteração da matriz intracelular e desestabilização de redes de filamento intermediário (citoqueratina) na camada superior do epitélio escamoso da pele para facilitar a liberação dos *vírions*. O gene E5 correlaciona-se com a proliferação celular. E6 e E7 estão envolvidos na transformação celular e carcinogênese. Os genes tardios, L1 e L2, codificam as proteínas do capsídeo viral (DOORBAR et al., 2012; PERALTA et al., 2013).

A entrada do vírus HPV ocorre por meio de microtraumas, intensificados durante o intercursos sexual, que é a principal forma de contaminação. Ele infecta as células-tronco do epitélio cervical, atingindo diretamente a ZT (MONSONEGO et al., 2011; WHEELER et al., 2013).

As células basais apresentam capacidade de proliferação na fase inicial da infecção. Os genomas virais permanecem no núcleo como epissomas e baixo número de cópias, os genes precoces virais são expressos. Após a divisão celular, uma célula filha migra da camada basal e sofre diferenciação celular. Essa replicação nas células diferenciadas caracteriza a fase produtiva do ciclo celular viral, que é dependente da síntese de DNA celular. A expressão de oncoproteínas E6 e E7 interfere no ciclo celular e mantém as células diferenciadas do epitélio em fase S, o que permite à amplificação do genoma viral. As proteínas L1 e L2 encapsulam os

genomas virais e os *virions* são liberados nas camadas superficiais do epitélio (Figura 5) (MOODY; LAIMINS, 2010).

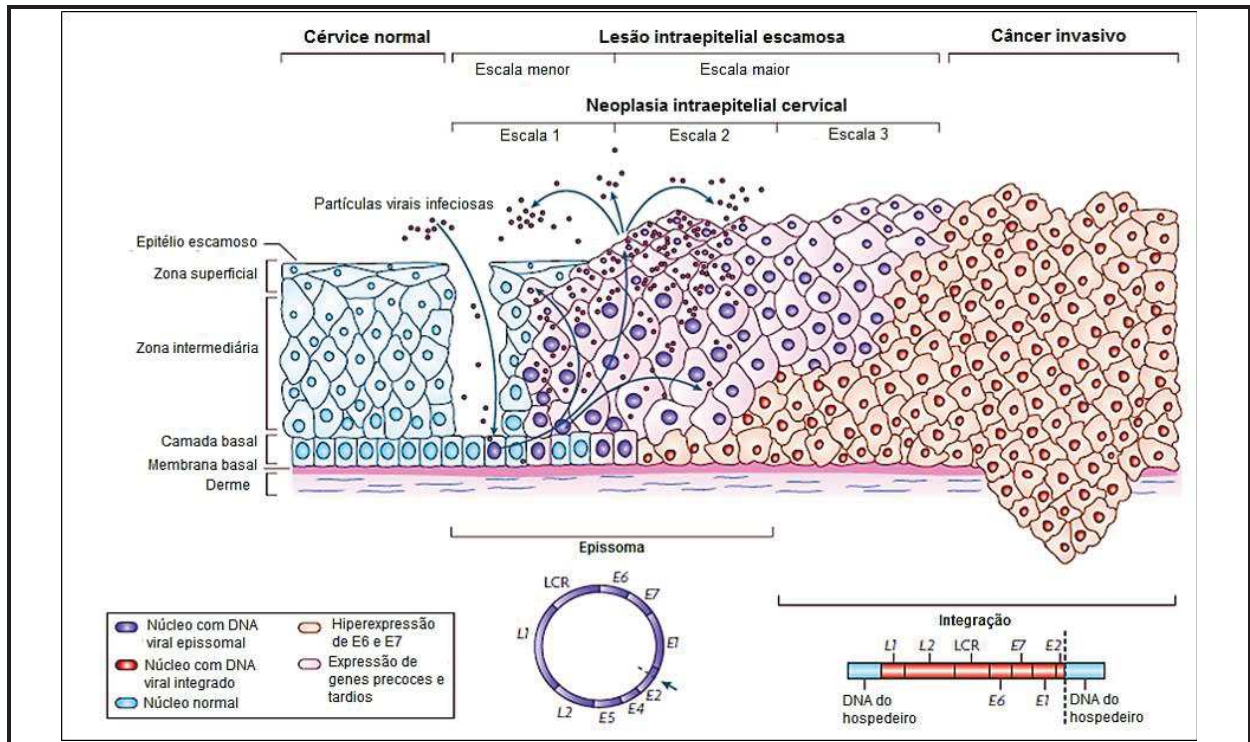


Figura 5. Representação da carcinogênese pelo HPV
Fonte: Adaptado de Woodman, Collins e Young (2007).

As proteínas E6 e E7 são capazes de estimular a proliferação e a transformação das células hospedeiras, além de inibir a apoptose e levar à imortalização celular. A oncoproteína E7 liga-se à proteína pRb no seu sítio de ligação aos fatores de transcrição, como membros da família E2F. Essa interação permite a estimulação da proliferação celular (DOORBAR et al., 2012; YUAN; FILIPPOVA; DUERKSEN-HUGHES, 2012). A proteína E7 também é capaz de associar-se a outras proteínas envolvidas na proliferação celular e imortalizar células por desregular mecanismos de apoptose (DOORBAR et al., 2012; YUAN; FILIPPOVA; DUERKSEN-HUGHES, 2012).

A proteína E6 inibe a apoptose e a correção de possíveis erros durante o processo de replicação do DNA no ciclo celular. E6 associa-se à p53 por intermédio da proteína associada à E6 (E6-AP), forma um complexo que se liga à ubiquitina ligase, E3, o que resulta na ubiquitinação de p53 e subsequente degradação proteolítica (DOORBAR et al., 2012; HOWIE; KATZENELLENBOGEN; GALLOWAY, 2010). A proteína supressora tumoral p53 também pode ser inativada pelo seu próprio sequestro no citoplasma pela proteína E6 viral. A proteína E6 também colabora na imortalização celular, promovendo a ativação da telomerase da célula

hospedeira (DOORBAR et al., 2012; HOWIE; KATZENELLENBOGEN; GALLOWAY, 2010; YUAN; FILIPPOVA; DUERKSEN-HUGHES, 2012).

À medida que a carga viral aumenta e as proteínas vão sendo acumuladas dentro da célula hospedeira, o aumento intracelular de E1 e replicações aberrantes começam a ocorrer e são gerados fragmentos de genoma viral que são ativamente modificados, recombinados e degradados, podendo ameaçar a estabilidade do genoma da célula hospedeira. Esses eventos levam à necessidade da integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro (DOORBAR et al., 2012). Durante o processo de integração, ocorre a degradação de E1 e E2, que leva à perda do controle da expressão de E6 e E7. O aumento do número de cópias do HPV integrado aumenta a expressão das proteínas E6 e E7 disponíveis e promove a instabilidade genômica. Nesse sentido, a atuação das proteínas oncogênicas somadas às integrações virais favorecem vários mecanismos de carcinogênese (DOORBAR et al., 2012; YUAN; FILIPPOVA; DUERKSEN-HUGHES, 2012).

As alterações genômicas promovidas pelo HPV vão desde mutações pontuais até o silenciamento gênico ou a ativação de proto-oncogenes, rearranjos gênicos e cromossomais e à perda de heterozigose. Mutações se acumulam na célula normal para que essa célula se transforme em uma célula neoplásica (DOORBAR, 2015).

As neoplasias invasivas do colo uterino são em geral precedidas por uma longa fase de doença pré-invasiva, que se caracteriza como uma gama de eventos que progridem da atipia celular a graus variados de displasia ou NIC antes da progressão ao carcinoma invasivo (SANKARANARAYANAN et al., 2005). As NICs representam as lesões precursoras do carcinoma do colo uterino e são caracterizadas em graus 1, 2 e 3 (INCA, 2011; SALIM et al., 2017).

Os graus de neoplasias mais avançados NIC2 e NIC3 apresentam uma maior proporção de células indiferenciadas do epitélio. Anomalias nucleares, como núcleos aumentados, maior razão núcleo-citoplasma, maior intensidade de coloração nuclear (hipercromasia), polimorfismo nuclear e variação do tamanho nuclear (anisocariose) são avaliados para realizar o diagnóstico. Há, com frequência, uma forte correlação entre a proporção do epitélio, que apresenta maturação e grau de anomalia nuclear (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2003).

As NICs apresentam diferenças e características histológicas específicas. A NIC 1 apresenta uma boa maturação celular, com anomalias nucleares mínimas, células indiferenciadas limitadas às camadas mais profundas (terço inferior) do epitélio. A NIC 2 é caracterizada por

alterações celulares displásicas, principalmente restritas à metade inferior ou aos dois terços inferiores do epitélio, com anomalias nucleares mais acentuadas que na NIC 1. Na NIC 3, diferenciação e estratificação podem estar totalmente ausentes. Anomalias nucleares estendem-se em toda a espessura do epitélio (Figura 6) (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2003).

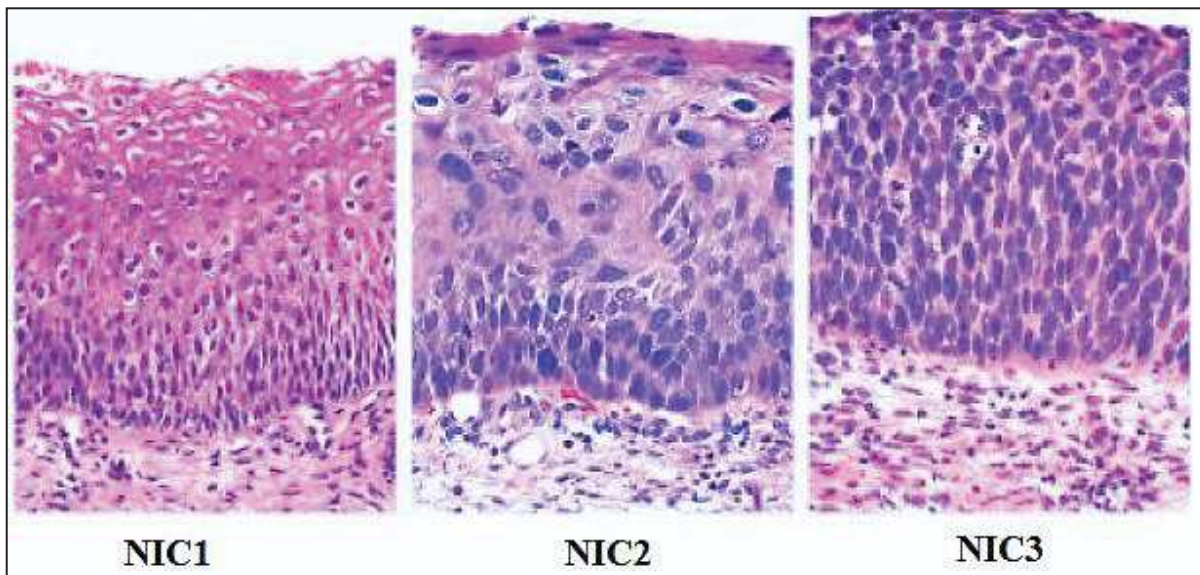


Figura 6. Representação histológica das lesões intraepiteliais cervicais (NIC)

Fonte: Sellors e Sankaranarayanan (2003).

A infecção persistente, provocada por um ou mais genótipos oncogênicos de HPV, é uma causa necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento da neoplasia cervical. A maioria das anomalias cervicais tem pouca probabilidade de progredir à condição de NIC ou ao câncer de colo uterino (CASTELLSAGUE et al., 2002; CASTELLSAGUÉ, 2008). Contudo, em casos em que há a progressão da doença e este evento não é interrompido as células tumorais rompem a membrana basal, invadem o estroma e podem levar à disseminação das células tumorais do câncer de colo uterino pelo mecanismo de metástase, que consiste em um movimento de células tumorais do sítio primário em direção à colonização para órgãos distantes. Esse movimento leva a um desfecho clínico desfavorável, capaz de causar a morte por fatores inerentes à própria doença ou por complicações advindas do tratamento preconizado, o que demonstra um pior prognóstico dessa doença em estágios mais avançados (STEEG, 2016).

2.4 Fatores Prognósticos para o Câncer de Colo Uterino

O estudo de sobrevida é um importante indicador de acompanhamento e controle do câncer, com frequência usado para avaliar a eficácia do tratamento, a disponibilidade e a

acessibilidade dos recursos, sendo útil na avaliação de resultados dos programas de saúde. Estudos dessa natureza permitem detectar os fatores que mais influenciam na taxa de sobrevivência dos casos de câncer (NAKAGAWA et al., 2011). Os fatores prognósticos são importantes na avaliação do câncer de colo uterino e compreendem o tamanho tumoral, o tipo histológico, o grau de diferenciação, a invasão linfovascular, a profundidade da invasão estromal, a presença de metástases linfonodais e o acometimento de margens cirúrgicas (FILHO, 2009; KIM et al., 2015).

O estadiamento clínico é um fator prognóstico importante, pois, ao considerar a disseminação localizada e à distância, se constitui em fator determinante ao planejamento terapêutico e à estimativa da taxa de sobrevivência, que varia de acordo com a progressão tumoral (KIM et al., 2015; QUINN et al., 2006). O estadiamento é realizado pela análise do tamanho do tumor, do comprometimento metastático linfonodal e da presença de metástase. O *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) estabeleceu recentemente diretrizes que são usadas para avaliar o estadiamento. A Classificação da *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO), de 2009, adotou a subclassificação (T) baseada no tamanho do tumor ≤ 4 cm e > 4 cm correspondendo, respectivamente, a T2a1 e T2a2. Para os tumores que disseminam além da parede pélvica ou do terço superior da vagina consideram-se lesões T2 (Tabela 1) (AMIN et al., 2017). A proposta recomendada para o estadiamento obedece aos seguintes passos: palpação, inspeção, colposcopia, curetagem endocervical, histeroscopia, cistoscopia, urografia excretora, raio-X de pulmão e ósseo. Tomografia computadorizada, ressonância magnética e tomografia por emissão de pósitrons, se disponíveis nos serviços hospitalares, também poderão ser utilizadas (AMIN et al., 2017; KYUNG et al., 2015).

Tabela 1. Classificação dos tumores quanto à definição de tumor primário do câncer de colo uterino

Categoria T	Estágio Figo	Critérios T
TX		Tumor primário não pode ser avaliado.
T0		Nenhuma evidência de tumor primário.
T1	I	Carcinoma cervical confinado ao útero (a extensão ao corpo deve ser desconsiderada). Carcinoma invasivo diagnosticado apenas por microscopia.
T1a	IA	Invasão estromal com uma profundidade máxima de 5,0 mm medida a partir da base do epitélio e uma extensão horizontal de 7,0 mm ou menos. Envolvimento do espaço vascular, venoso ou linfático, não afeta a classificação.
T1a1	IAI	Invasão estromal medida de 3,0 mm ou menos de profundidade e 7,0 mm ou menos na horizontal.
T1a2	IA2	Invasão estromal medida de mais de 3,0 mm e não mais de 5,0 mm, com uma área horizontal de 7,0 mm ou menos.

(continua)

(conclusão Tabela 1)

Categoria T	Estágio Figo	Critérios T
T1b	IB	Lesão clinicamente visível confinada ao colo uterino ou lesão microscópica maior que T1a / IA2. Inclui todas as lesões macroscopicamente visíveis, mesmo aquelas com invasão superficial.
T1b1	IB1	Lesão clinicamente visível de 4,0 cm ou menos na maior dimensão.
T1b2	IB2	Lesão clinicamente visível de mais de 4,0 cm em maior dimensão.
T2	II	Carcinoma cervical invadindo além do útero, mas não para a parede pélvica ou para o terço inferior da vagina.
T2a	IIA	Tumor sem invasão parametrial.
T2a1	IIA1	Lesão clinicamente visível de 4,0 cm ou menos na maior dimensão.
T2a2	IIA2	Lesão clinicamente visível mais de 4,0 cm em maior dimensão.
T2b	IIB	Tumor com invasão parametrial.
T3	III	Tumor que se estende até a parede pélvica * e/ou envolve o terço inferior da vagina e/ou causando hidronefrose ou rim não funcionante.
T3a	IIIA	Tumor envolvendo o terço inferior da vagina, mas não se estende até a parede pélvica.
T3b	IIIB	Tumor que se estende até a parede pélvica e/ou causa hidronefrose ou rim não funcionante.
T4	IVA	Tumor invadindo a mucosa da bexiga ou reto e/ou se estendendo além da pelve verdadeira (o edema bolhoso não é suficiente para classificar um tumor como T4).

* A parede lateral pélvica é definida como o músculo, fâscia, estruturas neurovasculares e porções esqueléticas da pelve óssea. No exame retal, não há espaço livre de câncer entre o tumor e a parede pélvica.

Fonte: Adaptado de Amin et al. (2017).

O acometimento linfonodal pode ser avaliado por meios cirúrgicos ou imagens e, quando positivo, deve ser acompanhado da identificação da sua extensão e do estabelecimento do método diagnóstico (anatomopatológico ou radiológico), no entanto, não mudará o estadiamento clínico ou patológico do paciente, apesar da importância no planejamento terapêutico, podendo ser utilizado individualmente como fator prognóstico (AMIN et al., 2017).

O comprometimento linfonodal depende do local e do número de linfonodos comprometidos. O envolvimento dos linfonodos ilíacos internos, ilíacos externos e paraórticos aumenta o risco de propagação da doença e determina um pior prognóstico (Tabela 2)(AMIN et al., 2017). A presença de metástase linfonodal é um dos fatores importantes no prognóstico do câncer de colo uterino, com evidência no número e segmentos acometidos com pior prognóstico no acometimento dos linfonodos para-aórticos e ilíacos. O comprometimento das margens cirúrgicas também influencia negativamente o tempo de sobrevivência (FILHO, 2009). Células tumorais únicas ou pequenos conglomerados de células menores que 0,2 mm são denominadas células tumorais isoladas, que podem ser detectadas por estudo histológico ou por meio imuno-histoquímico, classificado como N0 (i+) (AMIN et al., 2017). As metástases do

tumor para locais adjacentes ou distantes levam a um pior prognóstico da doença. A presença de metástase é classificada como M1 e a doença passa a ser enquadrada no estadiamento IV (Tabela 2) (AMIN et al., 2017).

Tabela 2. Classificação dos tumores quanto ao comprometimento linfonodal e quanto à presença de metástases

Categoria N	Estágios FIGO	Critérios N
Nx		Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0		Nenhuma metástase linfonodal regional.
N0(i+)		Células tumorais isoladas em linfonodo (s) regional (is) não superior a 0,2 mm.
N1		Metástase linfonodal regional.
Categoria M	Estágios FIGO	Critérios M
M0		Nenhuma metástase distante.
M1	IVB	Metástase à distância (incluindo disseminação peritoneal ou envolvimento dos linfonodos supraclaviculares, mediastinais ou distantes: pulmão; fígado: ou osso)

Fonte: Adaptado de Amin et al. (2017).

A taxa de sobrevida em cinco anos varia entre 97,5%, nos tumores estágio IA1, e 9,3%, no estágio IVB (KIM et al., 2015; QUINN et al., 2006). O tamanho tumoral é relevante pois o aumento da extensão tumoral está relacionado à diminuição da sobrevida. No estadiamento I e II, tumores menores que 2 cm têm sobrevida de 95%, tumores que se encontram entre 2 e 3 cm, a sobrevida diminui para 79% e tumores acima de 4 cm para 47% (FILHO, 2009). O carcinoma de células escamosas apresenta melhor prognóstico do que os cânceres de outros tipos histológicos, no entanto, o tipo histológico não define o planejamento terapêutico como fator isolado (DENNY; QUINN; SANKARANARAYANAN, 2006).

A invasão linfovascular está associada à metástase dos linfonodos pélvicos e ao acometimento parametrial e vaginal. A profundidade da lesão pode ser definida em termos absolutos por milímetros ou por terços de invasão uterina, sendo um achado independente quando associado à sobrevida livre de doença e à presença de metástase linfonodal. O grau tumoral apresenta controvérsias como fator prognóstico independente e não deve definir o tratamento (DENNY; QUINN; SANKARANARAYANAN, 2006; KIM et al., 2015; QUINN et al., 2006).

2.6 Prevenção do Câncer de Colo Uterino

No câncer de colo uterino medidas de prevenção primária e secundária são estratégias usadas para diminuir a incidência da doença. A prevenção primária inclui, principalmente, a

vacina profilática contra o HPV de alto risco e a prevenção secundária, refere-se à detecção e ao tratamento das lesões precursoras (PETRY; WÖRMANN; SCHNEIDER, 2014). O Ministério da Saúde implementou no calendário vacinal, no ano de 2014, a vacina tetravalente, inicialmente para meninas de 9 a 11 anos e, a partir de 2017, para meninas de 9 a 14 anos, meninos de 11 a 14 anos, pessoas de 9 a 26 anos acometidos pelo HIV, pacientes transplantados e oncológicos (INCA, 2016).

Atualmente estão disponíveis três tipos de vacina contra o HPV: a bivalente, com os genótipos 16 e 18, a tetravalente, que inclui os 6, 11, 16 e 18, e a nonavalente, visando a prevenção de nove genótipos de HPV (16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 e 6, 11), no entanto, esta última ainda não é comercializada no Brasil. As vacinas são produzidas utilizando-se a proteína L1 do capsídeo do HPV, que, por meio de tecnologia de DNA recombinante, resulta em partículas semelhantes aos vírus (VLPs) (RODEN; WU, 2006).

O método de Papanicolaou é considerado a principal estratégia para a detecção precoce do câncer de colo uterino. No Brasil, o rastreamento com citologia oncótica é recomendado às mulheres na faixa etária entre 25 e 64 anos, que já tiveram atividade sexual, repetido a cada três anos após dois exames com resultados negativos realizados anualmente. Exceções são feitas para alguns grupos de pacientes, como mulheres imunossuprimidas e mulheres hysterectomizadas por indicação de lesões pré-neoplásicas de câncer de colo uterino, que devem manter o rastreamento anualmente (CORRÊA et al., 2017; INCA, 2016).

O exame de citologia é reconhecido mundialmente como seguro e eficiente, tendo por objetivo fundamental detectar e tratar precocemente as lesões precursoras. A utilização do exame preventivo do Papanicolaou, com uma cobertura que alcance no mínimo 80% da população alvo, possibilita a redução na incidência do câncer de colo uterino invasor de até 90% (CORRÊA et al., 2017).

A citologia de Papanicolaou é um método eficiente, reconhecido em meio médico, e apresenta uma sensibilidade e especificidade de aproximadamente 80%. Entretanto, resultados falso-negativos são relatados, com maior quantidade em virtude de erros na coleta de material e, também, a erros de interpretação do diagnóstico. Frente às limitações da técnica de citologia convencional, a citologia líquida surgiu como um método adicional e apresenta uma boa especificidade e sensibilidade. A citologia em meio líquido apresenta algumas vantagens, tais como a redução dos casos falsos-negativos, a possibilidade de obtenção de lâminas extras para a realização de testes moleculares e de captura híbrida, a apresentação de melhor preservação celular e mais facilidade de interpretação. Apesar das vantagens da citologia em meio líquido,

os altos custos e a *expertise* da equipe diagnóstica para a realização da técnica são algumas limitações recorrentes (CHEN et al., 2012; HEISE; LIMA, 2016).

A detecção do DNA HPV tem sido uma ferramenta promissora para a prevenção do câncer de colo uterino. Um estudo realizado na China evidenciou que a realização desse exame três vezes durante a vida da mulher reduziu em 56% a incidência de câncer de colo uterino invasor por permitir ações preventivas (LEVIN et al., 2013).

Estratégias complementares, como a pesquisa da expressão de p16 e Ki67 por imunohistoquímica, podem ser utilizadas e são diretamente associadas à severidade da lesão cervical (KANTHIYA et al., 2016; KRISHNAPPA et al., 2014; SHAIN et al., 2018).

2.7 Tratamento do Câncer de Colo Uterino

O tratamento do câncer de colo uterino é dependente dos diversos fatores prognósticos. No estágio IA1 a ocorrência de acometimento linfonodal é de cerca de 1% e o tratamento cirúrgico depende de outros fatores, como o desejo de gestação ou não. O tratamento preconizado é a histerectomia extrafascial em prole definida ou conização, caso ainda haja o desejo de gravidez (RASPAGLIESI et al., 2005). No estágio IA2, a ILV definirá a conduta, que poderá ser a traquelectomia, se houver desejo de gestação futura, ou a histerectomia extrafascial até histerectomia radical e também linfadenectomia (LN) pélvica. Em casos sem condição cirúrgica está reservada a radioterapia (DENNY; QUINN; SANKARANARAYANAN, 2006; DO NASCIMENTO; SILVA, 2015).

Nos estádios IB1 e IIA, os estudos mostram semelhança entre o tratamento radioterápico e cirúrgico e a escolha é dependente da idade e de outros fatores prognósticos (KIM et al., 2015; QUINN et al., 2006). Tanto no estágio IA2, quanto no IB e IIA, a quimiossensibilização, principalmente com cisplatina, melhora a sobrevida dessas pacientes em cinco anos (FILHO, 2009). Nos estádios IIB e IVA são indicadas a radioterapia externa e a braquiterapia; nos casos de ausência de invasão parametrial e vaginal pode-se realizar, em estádios IVA, a exenteração pélvica. O tratamento paliativo está proposto aos casos de estágio IVB (FILHO, 2009; KIM et al., 2015).

Vários tratamentos, tais como cirurgia, radioterapia e quimioterapia, podem curar mais de 90% de mulheres em fase inicial do câncer de colo uterino, pois a recorrência e a metástase levam a altos índices de mortalidade. Numerosos esforços têm sido realizados no intuito de

novas drogas e terapias gênicas para o tratamento desse tipo de câncer (GUPTA; KUMAR; DAS, 2018).

2.8 Transição Epitélio-Mesênquima

A disseminação das células cancerosas do tumor primário e a sua subsequente propagação para tecidos distantes envolvem etapas do processo de invasão e metástase que incluem uma sequência de eventos, como a migração das células tumorais para locais adjacentes ou distantes, intravasamento dessas células para o interior da circulação sanguínea, sobrevivência das células tumorais no sistema circulatório, deslocamento e extravasamento através da parede vascular em direção ao parênquima, formação de colônias e micrometástase nesse parênquima, que podem evoluir para lesões metastáticas (BRABLETZ et al., 2018). Um importante processo para a aquisição desses passos é a reativação do programa biológico da TEM durante o processo de carcinogênese (BANYARD; BIELENBERG, 2015; BRABLETZ et al., 2018; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2016; SAITO et al., 2015).

A TEM é um programa biológico em que as células cancerosas modificam o seu comportamento para invadir o estroma adjacente e aumentar o potencial de agressividade tumoral, o qual está relacionado à capacidade do tumor em vencer as pressões seletivas, como hipóxia, inflamação, escape da apoptose e senescência (BRABLETZ et al., 2018). A TEM é um dos mais importantes passos para a iniciação da metástase e ocorre principalmente nos tumores epiteliais (SATELLI; LI, 2011).

A TEM permite que uma célula epitelial polarizada, que normalmente interage com a membrana basal por meio da superfície basal, sofra modificações bioquímicas, moleculares e morfológicas, que vão resultar na aquisição de um fenótipo de célula mesenquimal com capacidade de migração, invasão e resistência à apoptose (NIETO et al., 2016). O processo da TEM promove mudanças em vários aspectos fundamentais da fisiologia celular, que inclui as alterações no citoesqueleto, a dissolução das junções células-células pela diminuição da expressão de E-Caderina e integrinas, a perda da polaridade apical basal, a aquisição de motilidade, com aumento da expressão de Vimentina, a habilidade de invasão e a reconfiguração da expressão de vários genes (SHIBUE; WEINBERG, 2017). Essas alterações são executadas, principalmente, pela ação dos fatores de transcrição da TEM, que são expressos por genes como os das famílias *SNAIL*, *TWIST* e *ZEB*. São fatores de transcrição da TEM: snail, twist, zeb (BRABLETZ et al., 2018).

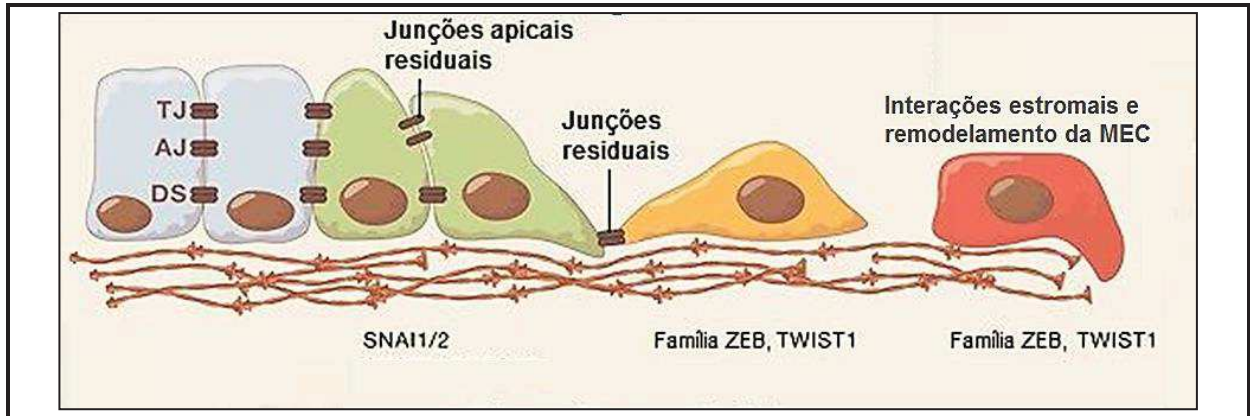


Figura 7. No programa TEM ocorre mudança do fenótipo epitelial para o fenótipo mesenquimal. Os genes das famílias SNAIL, ZEB e TWIST expressam os fatores de transcrição específicos do programa TEM, snail, zeb e twist.

Fonte: Adaptado de Nieto et al. (2016).

A TEM é um processo reversível, pois resulta de mudanças de fenótipo e, portanto, pode alternar entre os estados epiteliais para mesenquimais e de mesenquimais para epiteliais (KALLURI; WEINBERG, 2009). Essa mudança para o estado mesenquimal modifica as moléculas de adesão expressas pelas células e permite-lhes adotar um comportamento migratório e invasivo. O reverso desse processo (TME) está associado à perda dessa liberdade migratória, com células que adotam uma polarização ápico-basal e expressam os complexos juncionais, que são marcas de tecidos epiteliais (Figura 9) (NIETO et al., 2016; THIERY et al., 2009). Qualquer que seja a via de ativação desse processo, o fenômeno inicial consiste na inibição da expressão de E-caderinas, moléculas de ancoragem do citoesqueleto e que formam complexos entre as membranas celulares chamadas junções aderentes, importantes estruturas de adesão (LEE et al., 2012).

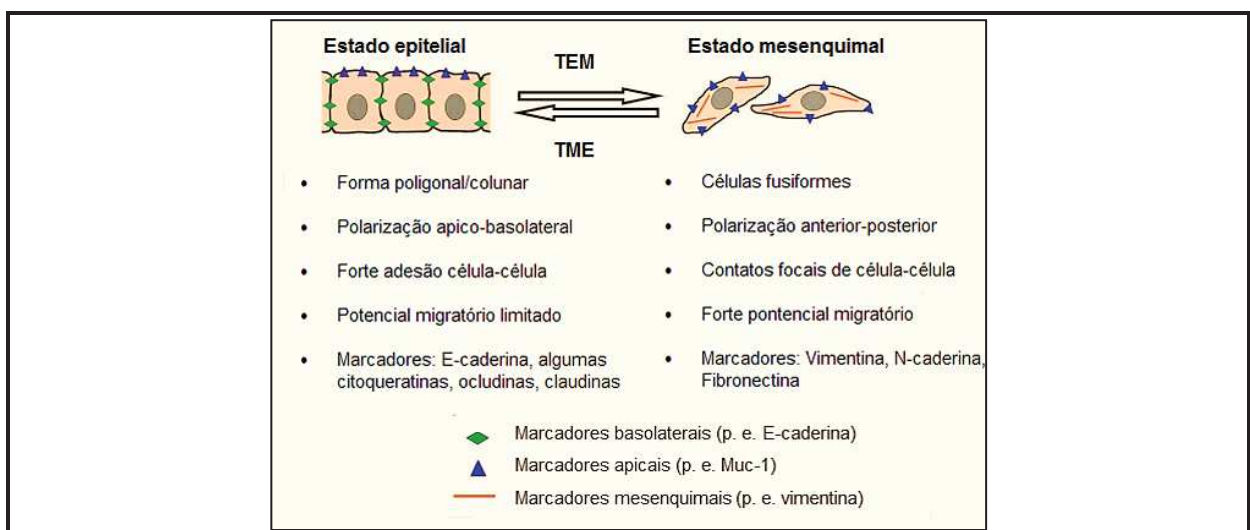


Figura 8. Transição epitélio-mesênquima e transição mesênquima-epitelial. Modificação do fenótipo epitelial para o fenótipo mesenquimal e de um fenótipo mesenquimal para o fenótipo epitelial

Fonte: Wang, Huang e Sun (2017).

A TEM é classificada em três configurações biológicas distintas (TEM I, II, III). A TEM do tipo I apresenta um papel importante na embriogênese. As células epiteliais compartilham funções das células vizinhas, adquirem características motoras e migram para outras localidades, tanto locais adjacentes quanto locais distantes. A TEM do tipo II atua na regeneração e na reconstrução tecidual após dano e está associada com a formação de fibrose e inflamação. A TEM do tipo III, no câncer, contribui na cascata de invasão-metástase para o deslocamento e a aquisição do fenótipo mesênquimal (KALLURI; WEINBERG, 2009).

Durante o processo de desenvolvimento embrionário, o programa TEM propicia a geração de vários tecidos e órgãos (PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2016). Na fase de gastrulação e delaminação da crista neural, leva ao desenvolvimento da cartilagem craniofascial e tecidos de linhagens ósseas, musculares, neuronais e melanócitos. Há a diminuição de adesão celular com perda de polaridade, seguida de ganho de habilidade de invasão e migração celular controlada (KALLURI; WEINBERG, 2009). Essa regulação é mediada pela via *Nocth* e *Wnt*/ β -*catenina* e fatores como fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF), que sinalizam a ação dos fatores de transcrição da TEM (FTs-TEM), dentre os quais *snail* e *twist*, com função de reprimir a expressão de E-caderina e, com isso, alterar a adesão celular, promover o rearranjo do citoesqueleto e a atividade de metaloproteínas (MMP) (LI et al., 2012; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2016). A migração morfogênética mediada pelo programa TEM completa-se e, então, pode ocorrer a diferenciação em células epiteliais pela regressão de *snail* e, assim, iniciar a transição mesênquima-epitelial (TME) (BANYARD; BIELENBERG, 2015; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2016).

No câncer, a reativação do programa da TEM consiste em vários fenômenos de reprogramação com propriedade em modificar a expressão de marcadores epiteliais celulares (BRABLETZ et al., 2018). Na progressão do câncer, os genes *snail*, *twist* e *zeb* exercem funções importantes por meio da expressão dos fatores de transcrição da TEM, atuando na iniciação, no crescimento, na colonização, na invasão metastática e na resistência à terapia (NIETO et al., 2016). No entanto, esse programa não é uniforme ou definido por um único caminho, que resulta na transição completa de células epiteliais em um fenótipo de células mesenquimais; estados intermediários provavelmente refletem o equilíbrio delicado entre fatores que induzem e reprimem o programa da TEM e, somando-se a isso, está claro que algumas vias são eventos específicos em determinados tecidos durante o estabelecimento da TEM (Figura 8) (NIETO et al., 2016).

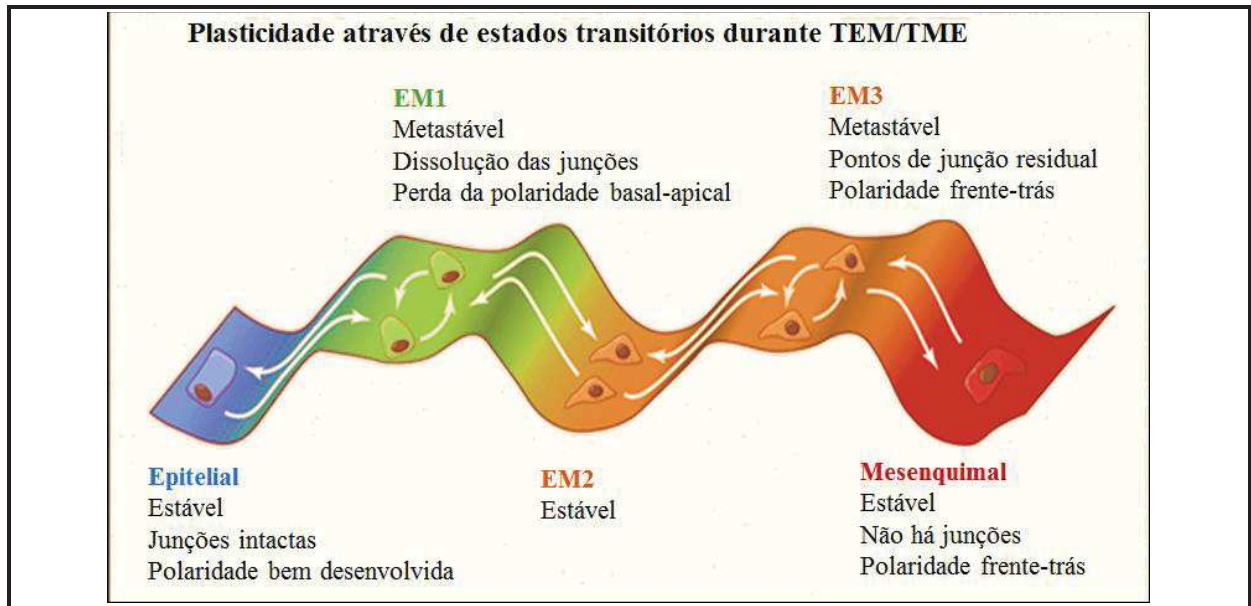


Figura 9. Plasticidade através dos estágios de transição durante o processo de TEM e TME
Fonte: Adaptado de Nieto et al. (2016).

Na fase de iniciação, pressões seletivas, como hipóxia e inflamação, levam ao aumento da atividade de β -catenina pela inibição da atividade de glicogênio 3 β - sintetase-quinase e diminuição da degradação de β -catenina. Esse aumento promove a expressão de snail e, subsequentemente, o programa TEM. A inflamação aumenta a capacidade de migração e de manutenção de um microambiente de imunossupressão. As atividades de snail e de twist conferem mais capacidade de resistência à apoptose. Twist e zeb1 têm sido apontados por suprimir as proteínas p21 e p16^{INK4}; alteram, portanto, proteínas reguladoras do ciclo celular, como p53 (KALLURI; WEINBERG, 2009; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2016).

A habilidade da autorrenovação sustentada garante à célula neoplásica vantagens ao crescimento tumoral e é influenciada pelos TFs-TEM, os quais apresentam habilidade em direcionar células com características de células-tronco tumorais (HUANG; ROFSTAD, 2017; LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017; NIETO et al., 2016)

No processo de progressão tumoral, as células tumorais deixam o tumor primário após o ganho de alterações na forma do seu citoesqueleto. A célula tumoral demonstra um epitélio de fenótipo mesenquimal, com propriedade de invasão para tecidos adjacentes e migração para os tecidos sanguíneos. As células tumorais circulantes intravasam pelos vasos e migram através das junções endoteliais (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017; SAITO et al., 2015).

O fator de transcrição *twist* está relacionado ao intravasamento e à sobrevivência da célula tumoral na circulação (NIETO et al., 2016). Depois do intravasamento, as células tumorais circulantes encontram situações de estresse pela somatória de fatores como a ação da força hidrostática, pela ação do óxido nítrico nos sinusoides hepáticos, aumento da apoptose pela expressão de genes como *DARC* e *KAI1* e ação das células *natural killer* (NK) (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017; NIETO et al., 2016; SAITO et al., 2015). Na tentativa de evadir à morte celular e adquirir potencial metastático, as CTCs vão ganhando, cada vez mais, por meio do programa TEM, mecanismos de sobrevivência. A expressão de genes antiapoptóticos – como *BCL2* e *BCLX* – pode estar aumentada nessa condição (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017; NIETO et al., 2016; SAITO et al., 2015). As CTCs e plaquetas expressam $\alpha 5\beta 3$ integrina e, assim, promovem a agregação das CTCs com formação de êmbolos tumorais pelo mecanismo de agregação plaquetária, vencendo a morte celular por *anoikis* (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017; SAITO et al., 2015).

A habilidade das células tumorais circulantes em sobreviver na circulação aumenta o potencial de colonização tumoral. As CTCs podem ter um crescimento dentro do vaso e romper o vaso ou, por um mecanismo mais seletivo, podem mimetizar os leucócitos, acoplar-se às proteínas selectinas P e E do endotélio e seguir para um novo passo dentro da cascata metastática, um processo denominado extravasamento. Nesse momento, a expressão de *VEGF* facilita a ruptura das células endoteliais e o extravasamento das CTCs (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017).

No programa da TEM, a angiogênese, um processo de neoformação de vasos sanguíneos, é um evento crucial no desenvolvimento tumoral e metastático. O crescimento tumoral leva a um microambiente de hipóxia no centro do tumor pela diminuição do suprimento sanguíneo e, conseqüentemente, pela diminuição dos nutrientes, levando a altos níveis de dióxido de carbono e baixo pH (SAITO et al., 2015). Para corrigir essa situação de hipóxia, as células tumorais produzem o fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1), que funciona como fator de transcrição para fatores de crescimento, aumentando o potencial de progressão do câncer por meio da regulação de outros mediadores angiogênicos, como fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), TGF β , fator de crescimento insulina-1 (IGF-1) e FGF, sendo o VEGF o mais relevante (SAITO et al., 2015).

A hipóxia leva à degradação da membrana basal e separação dos pericítos por ação das proteases. Com isso, as células endoteliais migram para o microambiente tumoral, seguindo o

gradiente do fator angiogênico para formar a neovascularização. A proliferação é suprimida por meio da ligação do DLL4 (ligante de Notch), estimulado por VEGF. A fixação do pericito é estimulada pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFB) (Figura 10) (SAITO et al., 2015).

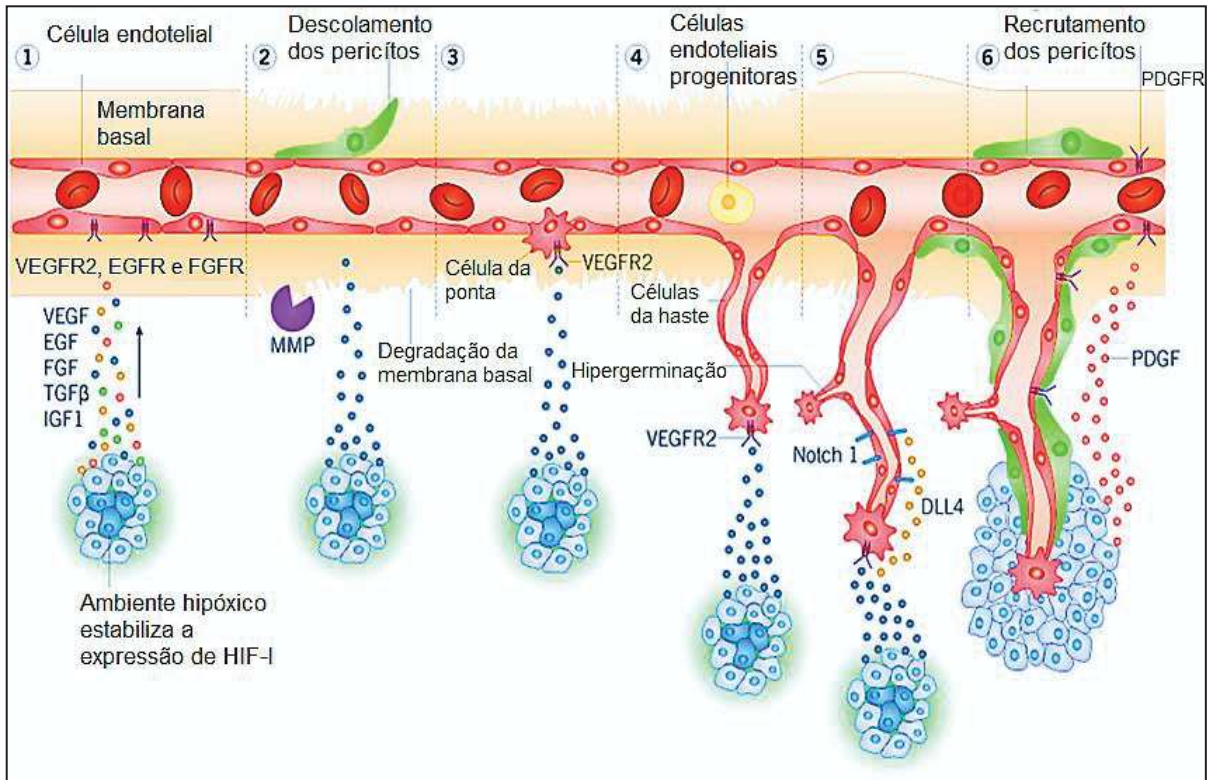


Figura 10. Etapas de angiogênese na vascularização tumoral.

Fonte: Adaptado de Cancer Research Product Guide (2015).

A TEM confere às células tumorais a habilidade para invadir, sobreviver na circulação, extravasar, porém, o estabelecimento de uma cascata completa é relativamente infrequente. O crescimento de uma colônia metastática em órgãos distantes representa a fase mais letal da progressão maligna de um tumor. As CTCs podem não ter a habilidade para proliferarem por não induzirem o mecanismo de angiogênese ou por sofrerem supressão ativa pelo sistema imune ou caminharem para a morte celular (Figura 11) (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017).

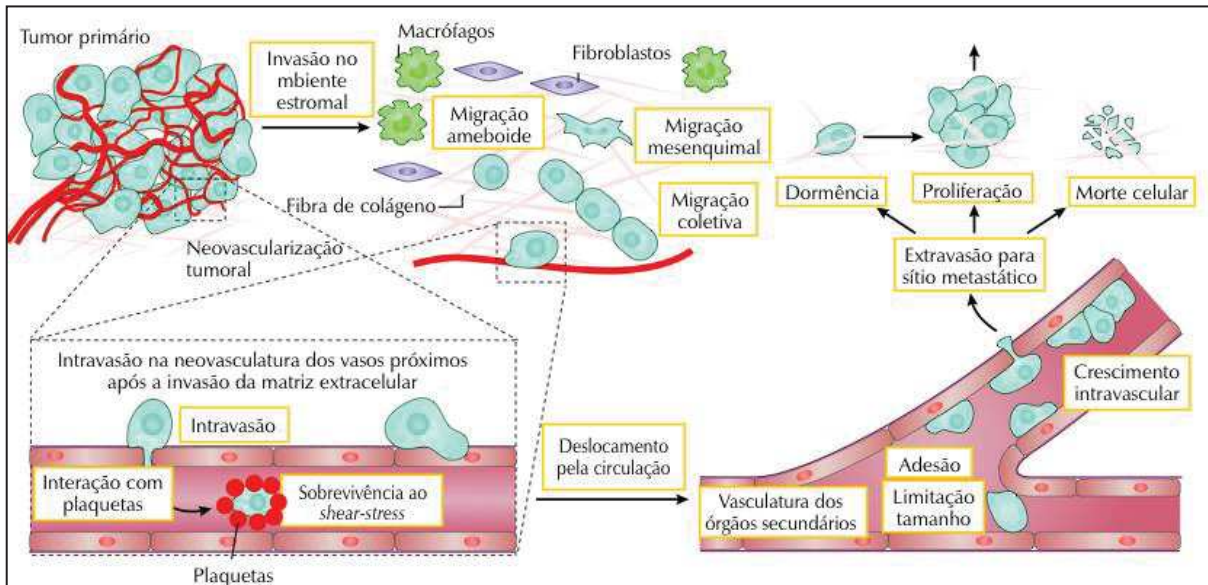


Figura 11. Etapas do processo metastático

Fonte: Saito et al. (2015).

2.9 Vimentina

A Vimentina é uma proteína pertencente à família dos filamentos intermediários que compõem o citoesqueleto celular (SANGHVI-SHAH; WEBER, 2017). O citoesqueleto é uma importante estrutura celular, cuja principal função é coordenar a distribuição de organelas e orientar a forma celular; é formado por microfilamentos, filamentos intermediários e microtúbulos ou a associação entre eles (SANGHVI-SHAH; WEBER, 2017; ZHANG et al., 2017). Os FIs são proteínas componentes do citoesqueleto, expressas em diferentes tipos de células e que desempenham papéis e funções importantes na manutenção das características morfológicas celulares; são classificadas em cinco famílias de genes diferentes, embasadas no padrão de expressão, estrutura e identidade de sequência. Uma sexta família de filamentos intermediários compostos por lamininas reside no núcleo (Tipo V) (SANGHVI-SHAH; WEBER, 2017). Os FIs dos tipos I e II compreendem as queratinas ácidas e básicas encontradas, principalmente, no tecido epitelial. O tipo III inclui a Vimentina, nas células mesênquimais, e a desmina, nas células musculares. O tipo IV é composto por neurofilamentos nos neurônios. Os FIs do tipo V (lamininas) estão no núcleo das células e do tipo VI (nestina), presentes nos neurônios embrionários (GUO et al., 2013; SATELLI; LI, 2011).

A proteína Vimentina é uma das mais abundantes e altamente conservadas dentre os FIs do tipo III e é principalmente expressa em células de origem mesenquimal (RIDGE et al., 2016). Essa proteína atua como um marcador canônico da TEM e está envolvida em várias condições,

como câncer, inflamação e cataratas congênitas (DAVE; BAYLESS, 2014; DOS SANTOS et al., 2015; RIDGE; et al., 2016; STEVENS et al., 2013).

O gene que codifica a proteína Vimentina, conhecido como *VIM*, é de cópia única e está localizado no cromossomo 10p13 (Figura 12). O gene *VIM* é regulado por um mecanismo complexo de controle da expressão gênica que inclui a região TATA box, oito regiões putativas GC box e alguns sítios de ligação, dentre eles o sítio de ligação ao NF-KB. O NF-KB ativado pelas células tumorais tem papel importante na hiperexpressão da Vimentina por ligar-se ao seu promotor, sugerindo a importância dessa interação tanto na ativação quanto na manutenção da TEM (KIDD; SHUMAKER; RIDGE, 2014; RIDGE; et al., 2016; SATELLI; LI, 2011).

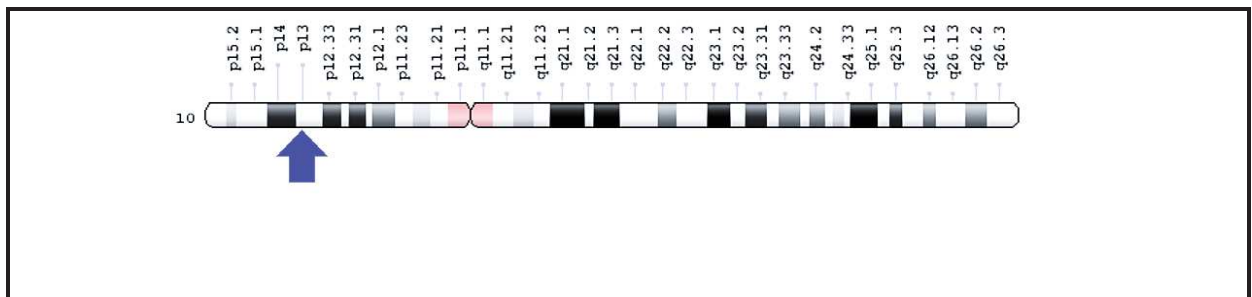


Figura 12. Localização cromossômica do gene 10p13C
Fonte: Genetics Home Reference (2018).

A Vimentina é uma proteína de 57 kDa composta por 466 aminoácidos, que apresenta um domínio *rod* α -helicoidal central altamente conservado, flanqueado por domínios terminais não- α -helicoidais N e C-terminais, denominados domínio *head* (77 resíduos) e *tail* (61 resíduos), respectivamente. Juntos, esses domínios se associam para formar um cilindro que faz parte do bloco de construção estrutural básico para toda a família de proteínas de FIs (Figura 13) (DAVE; BAYLESS, 2014; SATELLI; LI, 2011).

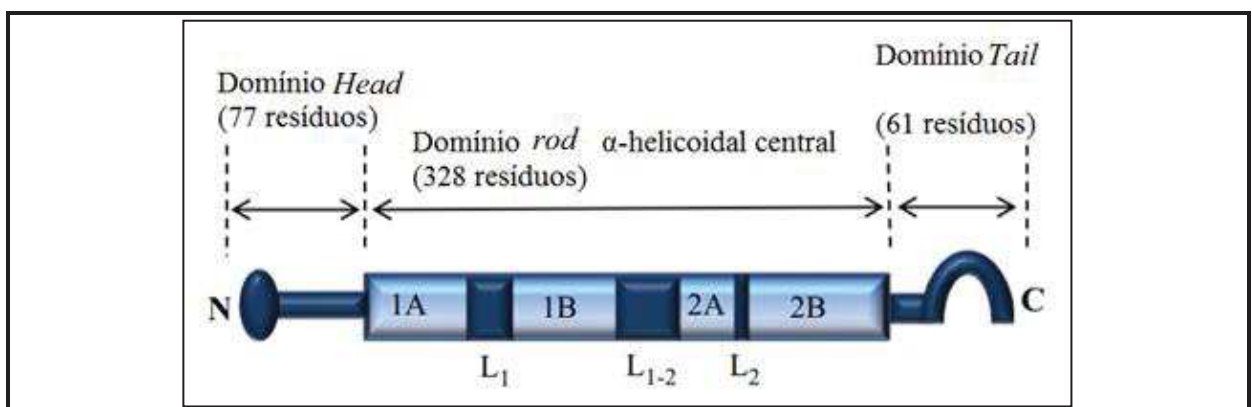


Figura 13. Estrutura do monômero de Vimentina.
Fonte: Adaptado de Dave e Bayless (2014).

O filamento de Vimentina origina-se pela união de dois homodímeros por meio do domínio central, que, por sua vez, associam-se e formam os protofilamentos. A Vimentina é expressa em vários tipos de células precursoras, como pancreáticas, de Sertoli, neuronais, endoteliais dos vasos sanguíneos, fibroblastos, tubulares renais, macrófagos e neutrófilos (RIDGE et al., 2016).

A expressão de Vimentina ocorre principalmente nas células de origem mesenquimal, onde é formada a rede do citoesqueleto de Vimentina, composta por filamentos robustos, que se estendem da periferia nuclear à membrana celular, conferindo resistência mecânica às células (RIDGE et al., 2016). Embora esse papel arquitetônico tenha sido considerado por muito tempo como a principal função da Vimentina, sabe-se hoje que essa proteína desempenha um importante papel nas vias de transdução de sinais, pode interagir com uma vasta rede de proteínas e, dessa maneira, atuar no posicionamento de organelas, na migração, adesão e sinalização celular (DAVE; BAYLESS, 2014; PÉREZ-SALA et al., 2015). Ela interage com grande número de proteínas e dessa interação derivam várias funções celulares, algumas delas mostradas na Tabela 3 (SATELLI; LI, 2011).

Tabela 3. Interação da Vimentina com proteínas e função celular

Proteína de interação	Função
Formiminotransferase ciclodesaminase	Integra complexo de Golgi e complexa-se com FIs do citoesqueleto
Uridina fosforilase	Função desconhecida
HnRNP	Replicação viral
Actina-like	Organização do filamento de Vimentina
Periplaquina	Intermedia a localização celular
Desmoplaquina	Liga os FIs com desmossomos
YESK	Suporte molecular para Yes quinase
Cgmpk	Fosforilação da Vimentina
Alfa-cristalino	Aumenta a agregação da Vimentina
Filamina	Formação de extensões celulares
sc70	Regulação de genes <i>heat-shock</i>
IFAP-300	Diferenciação das células da lente
Plectina	Integração do citoplasma
Caveolina-1	Polarização anterior da caveolina-1 na transmigração celular
Rab9	Transporte intracelular de lipídeos
Scrib	Migração e agregação celular
AptA	Ativa a proteína quinase Erk1/2
TSGA10	Influencia a função do antígeno (APC)

Fonte: Adaptado de Satelli et al. (2011).

As interações célula-matriz e o processo de adesão celular são eventos cruciais em vários processos biológicos e importantes na TEM e na progressão tumoral. A Vimentina atua como regulador da adesão e migração mediadas pelas integrinas (KIM et al., 2016b; SATELLI; LI, 2011). Foi observado que as subunidades β das integrinas apresentam caudas

citoplasmáticas que funcionam como a plataforma de ligação para muitos de seus reguladores. Os reguladores podem ligar cooperativa ou exclusivamente às caudas citoplasmáticas de várias subunidades da integrina com diferentes afinidades de ligação (KIM et al., 2016b; SATELLI; LI, 2011). Os filamentos de Vimentina na membrana plasmática podem fornecer sítios de inserção de integrinas por interação direta com as caudas das integrinas. Essas interações podem resultar em agregação de integrinas e maior adesão celular (KIM et al., 2016b).

A Vimentina pode atuar como um efetor da sinalização H-Ras. A expressão de H-Ras parece converter os filamentos de Vimentina em agregados próximos ao núcleo, onde não ocorre a ligação dela à integrina. Além disso, o aumento dos filamentos de Vimentina acessíveis à integrina do tipo $\beta 3$ aumenta a ligação da integrina aos seus ligandos, induzindo o agrupamento de integrinas. A Vimentina também interage com a integrina do tipo $\beta 1$ e isso parece aumentar a ligação da integrina $\alpha 5\beta 1$ ao seu ligante, a fibronectina (KIM et al. 2016a, 2016b).

A fosforilação da Vimentina está associada às integrinas e é um evento necessário para o tráfego e a reciclagem eficiente de um substrato da integrina do tipo $\beta 1$. A fosforilação, em particular, executada pelos membros da família da proteína quinase C (PKC), bem como outras serina/treonina quinases, deve ocorrer em sítios intactos no domínio principal da Vimentina. Esse mecanismo regula o transporte da integrina na célula, afetando tanto as propriedades adesivas quanto a migração (IVASKA et al., 2005).

Mediante o exposto, o controle desempenhado pela Vimentina, no que se refere aos diversos processos celulares mediados por integrinas, como adesão, migração e invasão, sugere que a interrupção da interação integrina-Vimentina pode ser um caminho no desenvolvimento de terapias promissoras no tratamento contra o câncer (DAVE; BAYLESS, 2014; KIM et al., 2016a, 2016b).

Os filamentos estáveis de Vimentina são reorganizados pelo mecanismo de fosforilação, pós-traducional, que controla a associação e a desassociação dos filamentos de Vimentina. Esse mecanismo de desorganização do FI é essencial durante a divisão celular (DAVE; BAYLESS, 2014; PÉREZ-SALA et al., 2015). A Vimentina é excelente substrato para várias quinases e vários de seus sítios de fosforilação já foram identificados (Tabela 5) (DAVE; BAYLESS, 2014; SATELLI; LI, 2011).

Tabela 4. Alguns sítios de fosforilação da Vimentina por quinases

Quinase	Sítio de fosforilação na Vimentina
PKA	Ser6, Ser24, Ser28, Ser38, Ser46, Ser50, Ser65, Ser72
PKC	Ser6, Ser8, Ser9, Ser20, Ser24, Ser25, Ser28, Ser33, Ser38, Ser41, Ser50, Ser65
CaMKII	Ser38, Ser82
PAK	Ser25, Ser38, Ser50, Ser65, Ser72
Cdk-1	Ser41, Ser55
ROCK	Ser38, Ser71
Aurora-B kinase	Ser6, Ser24, Ser38, Ser46, Ser64, Ser65, Ser72, Ser86
PLK-1	Ser82

Fonte: Adaptado de Dave e Bayless (2014).

A fosforilação da Vimentina está associada a consequências funcionais. A proteína p21-quinase ativada (PAK) fosforila a Vimentina principalmente nos locais Ser38 e Ser72, o que conduz a uma diminuição da formação de filamentos *in vivo*. As PAKs fosforilam a Vimentina em vários resíduos de serina e essa fosforilação está envolvida na regulação da reorganização estrutural da Vimentina. A Aurora Quinase B, um regulador chave envolvido nos processos mitóticos, fosforila a Vimentina e regula a separação de seus filamentos durante o processo citocinético. A proteína fosfatase 2A (PP2A) associa-se à Vimentina e previne a fosforilação, desempenhando um papel fundamental na regulação da dinâmica do FI em intérfase (SATELLI; LI, 2011).

Além das fosforilações, a Vimentina é o alvo de várias outras modificações pós-traducionais como, por exemplo, citrulinação, glutationilação, sumoilação, nitrosilação e carbonilação, que podem estar envolvidas na regulação da rede de Vimentina sob condições de estresse (PÉREZ-SALA et al., 2015). A citrulinação, processo que resulta na desaminação de resíduos de arginina dentro do domínio principal da Vimentina, tem efeitos negativos severos na organização dos filamentos. A glutationilação da Vimentina em neurônios parece aumentar a estabilidade dos filamentos, impedindo a fosforilação. Uma modificação especial é a que ocorre no glioblastoma, onde as células promovem a sumoilação da Vimentina no aminoácido 354, que desempenha um papel na manutenção da forma celular e motilidade (DAVE; BAYLESS, 2014; SATELLI; LI, 2011).

A Vimentina não atua apenas como uma proteína de suporte celular, mas também intermedia várias vias de sinalização e processos celulares através da interação com um grande número de moléculas e proteínas adaptadoras (DAVE; BAYLESS, 2014; SATELLI; LI, 2011). Foi demonstrado que a Vimentina interage com a proteína Erk fosforilada, impedindo a retirada do grupamento fosfato, estabilizando a proteína Erk e permitindo seu transporte no interior da célula, modula as cascatas referentes a MAPK (PÉREZ-SALA et al., 2015; SATELLI; LI,

2011). Trabalha em conjunto com uma proteína quinase, AKT1, bastante correlacionada com o câncer, e essa ligação com a Vimentina fosforilada a protege da proteólise induzida por caspases, o que leva ao aumento da motilidade celular e à invasão de células de sarcoma de tecidos moles (SATELLI; LI, 2011; ZHU et al., 2011).

A Vimentina fosforilada interage com a proteína 14-3-3, que apresenta um papel importante no ciclo celular e em diversos processos celulares. Essa interação com a proteína 14-3-3 promove a montagem de Raf-14-3-3 e de outros complexos, sugerindo que a Vimentina regula os complexos 14-3-3, controla várias vias de sinalizações intracelulares e, conseqüentemente, o ciclo celular (SATELLI; LI, 2011; TZIVION; LUO; AVRUCH, 2000).

A Vimentina também atua no controle da atividade de proteínas envolvidas na migração celular, como é o caso da proteína Scrib. Mediante a interação das duas proteínas, Scrib é protegida da degradação mediada pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Logo, a hiperexpressão de Vimentina durante o evento TEM parece promover uma maior estabilização de Scrib e uma maior promoção da migração celular e da capacidade invasiva das células (PHUA; HUMBERT; HUNZIKER, 2009; SATELLI; LI, 2011).

Outra ação associada à Vimentina é o aumento da migração celular pela interação com a receptora tirosina quinase AXL, aumentando a expressão de AXL. A hiperexpressão de Vimentina também é associada ao processo TEM pela associação com SLUG e RAS (VUORILUOTO et al., 2011). A Vimentina interfere no mecanismo de diferenciação dos osteoblastos imaturos, principalmente pela inibição da osteocalcina. Isso ocorre por meio da interação da Vimentina com o fator de transcrição ativador 4 (ATF4), que termina por inibir sua função transcricional (Figura 14) (LIAN et al., 2009).

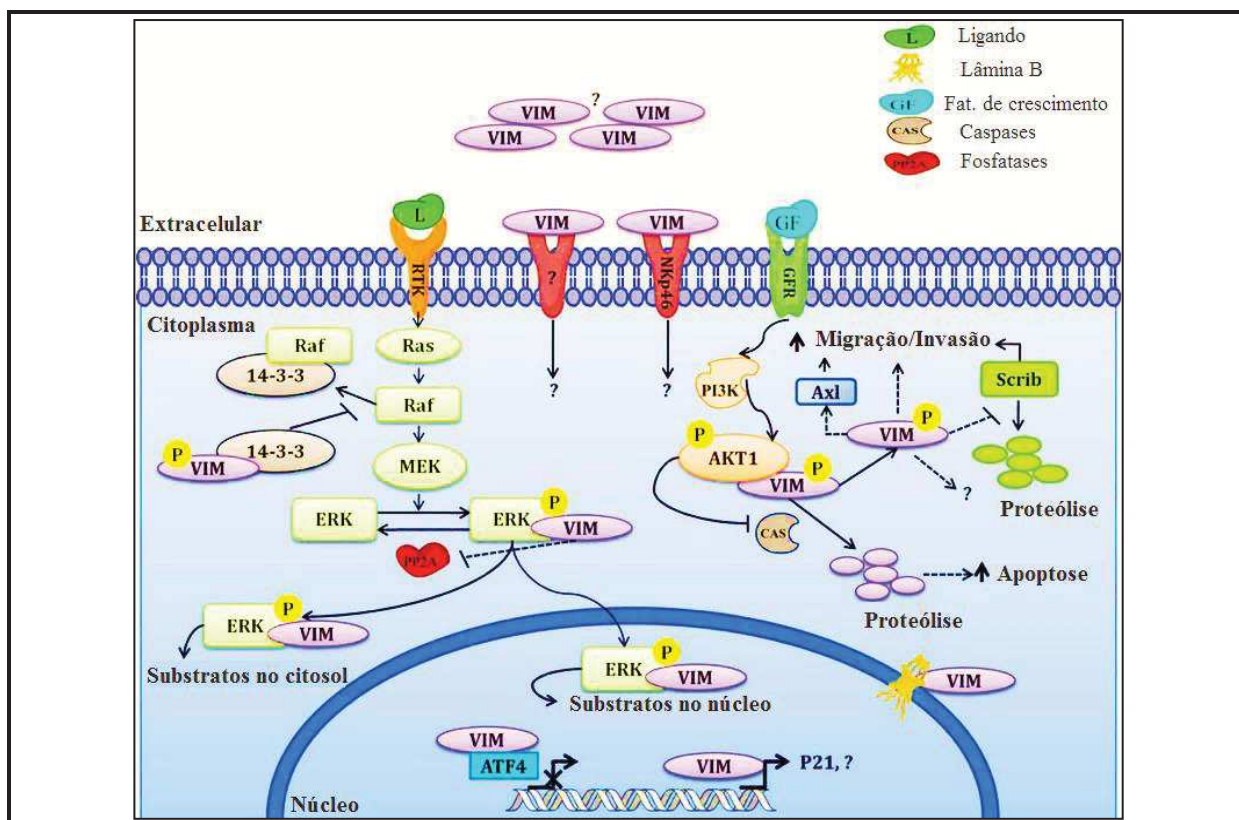


Figura 14. O papel da Vimentina no câncer
Fonte: Adaptado de Satelli e Li (2011).

O fato de a Vimentina ter a característica de interagir com vários tipos de proteínas possibilita que ela atue como um potente regulador em uma diversidade de funções. Alterações na expressão da Vimentina já foram descritas em várias doenças e no câncer a sua presença é correlacionada com metástase e um pior prognóstico (SATELLI; LI, 2011).

A Vimentina foi alvo de investigações no carcinoma epidermoide de cavidade oral (CEC ORAL) e a hiperexpressão de Vimentina foi associada ao óbito desses pacientes (LIU et al., 2010). Em outros estudos, que incluíram tumores de cabeça e pescoço, a expressão de Vimentina parece aumentar à medida que o tumor cresce. Foi observado que a expressão citoplasmática dela em linhagens celulares de tumores de cabeça e pescoço pode variar de acordo com estágio de proliferação, características intrínsecas celulares, localização do tumor (DUTSCH-WICHEREK, 2010). Em um estudo com melanoma primário, foram encontrados altos níveis de expressão de Vimentina em pacientes com metástases hematogênicas, indicando pior prognóstico (LI et al., 2010). Em carcinomas de esôfago, a expressão de Vimentina foi fator independente de risco para metástases em linfonodos, com risco três vezes superior para pacientes positivos para o marcador, além de estar frequentemente expressa em metástases linfonodais de carcinomas (JIN et al., 2010). Um estudo com amostras de colangiocarcinoma

em microarranjos teciduais, com a utilização da técnica de IHQ, correlacionou o aumento da expressão de Vimentina como marcador independente de um pior prognóstico (MAO et al., 2013). O aumento da expressão de Vimentina em adenocarcinomas ductais pancreáticos, também pela técnica de IHQ em microarranjos teciduais do tumor pancreático, correlacionou a expressão de Vimentina com a diminuição da sobrevida após o tratamento cirúrgico (HANDRA-LUCA et al., 2011).

Os estudos que avaliaram a expressão da Vimentina no processo da TEM no câncer de colo uterino foram iniciados em linhagem de células tumorais cervicais e mostraram que ela estava associada com a invasão e progressão desse tipo de câncer (GILLES et al., 1996; LEE et al., 2008). Contudo, poucos estudos avaliaram a expressão de Vimentina por IHQ em câncer de colo uterino (HUSAIN et al., 2016; MYONG, 2012; YU et al., 2015). Um estudo realizado com microarranjos de amostras de tecido de carcinoma *in situ* e invasor comparou o tecido normal de controle e tecido tumoral por meio de IHQ e observou que não houve expressão de Vimentina em tecido normal, e sim aumento da porcentagem da imunomarcação à medida que havia maior invasão. Considerou-se, assim, que o aumento da expressão da Vimentina pode ser utilizado como um importante marcador da TEM na progressão do câncer *in situ* para microinvasor e invasor (MYONG, 2012).

Um estudo realizado na China avaliou a expressão citoplasmática da Vimentina e a correlacionou com alguns fatores prognósticos, como idade, tamanho do tumor, estadiamento, grau de diferenciação, local de invasão e metástase linfonodal. Foi encontrada associação significativa entre ela e o local de invasão, com o grau de diferenciação e metástase linfonodal (YU et al., 2015). Outra pesquisa realizada no Sudão avaliou o significado clinicopatológico da Vimentina em câncer de colo uterino. Também foi correlacionada com a idade e com o grau de diferenciação. Houve uma associação significativa entre ela e o grau de diferenciação (HUSAIN et al., 2016).

Esses estudos concluíram que a Vimentina desempenha uma função importante no desenvolvimento e na progressão do câncer de colo uterino, podendo ser usada como marcador de progressão tumoral. No entanto, são necessários mais estudos para elucidar a associação da expressão da Vimentina com os fatores prognósticos (HUSAIN et al., 2016; YU et al., 2015).

Assim, este estudo teve por objetivo investigar a expressão de Vimentina em câncer de colo uterino, buscando associar sua expressão com fatores prognósticos clássicos desses tumores. Nossa hipótese inicial é de que a alta expressão de Vimentina está associada aos fatores de pior prognóstico neste tipo de câncer e à menor sobrevida.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o papel prognóstico da expressão da Vimentina em câncer de colo uterino.

3.2 Objetivos Específicos

1. Descrever as características sociodemográficas e clinicopatológicas das pacientes com câncer de colo uterino.
2. Avaliar as associações entre as características clinicopatológicas e a sobrevida das pacientes com câncer de colo uterino.
3. Avaliar, por meio de imuno-histoquímica, a expressão de Vimentina nos espécimes de câncer de colo uterino selecionados.
4. Investigar as possíveis associações entre a expressão de Vimentina e as características clinicopatológicas dos casos de câncer de colo uterino.
5. Avaliar as possíveis associações entre a expressão de Vimentina e a sobrevida das pacientes com câncer de colo uterino.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos Éticos da Pesquisa

Estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás – CEP/ACCG, por meio do parecer número CAAE:13580613.5.0000.031 (Anexo B).

4.2 Tipo de Estudo e Casuística

Este é um estudo retrospectivo, analítico e epidemiológico. A seleção de casos foi realizada por meio de busca ativa nos arquivos do setor de anatomia patológica do Hospital Araújo Jorge, localizado em Goiânia, no estado de Goiás. Foram levantados os exames anatomopatológicos com diagnóstico de câncer de colo uterino no ano de 2006 e, inicialmente, foram selecionados 219 prontuários e preenchidas fichas de registro elaboradas especificamente para este estudo, para a coleta dos seguintes dados: número do prontuário, data de nascimento, idade na data do diagnóstico, procedência, estado civil, tabagismo, etilismo, antecedente pessoal de neoplasia, histórico familiar de neoplasia, sexarca, *status* menstrual, uso de contraceptivo oral, data do diagnóstico, tipo histológico do tumor, grau tumoral, tamanho do tumor, comprometimento linfonodal, metástase à distância, extensão da lesão, estadiamento clínico e *status* do último seguimento da paciente.

Os critérios de inclusão utilizados foram: mulheres com diagnóstico histopatológico confirmado de câncer de colo uterino, presença de blocos de parafina contendo o tumor – em quantidade suficiente para a análise –, dados sociodemográficos e clínico-patológicos completos e material para análise obtido antes da radioterapia. No entanto, foi necessário excluir alguns casos, a saber: 10 (dez) casos sem diagnóstico confirmado de câncer de colo uterino, 16 (dezesesseis) casos que só apresentaram amostras depois do tratamento radioterápico, 10 (dez) casos que perderam seguimento, 64 (sessenta e quatro) casos em que os blocos de parafina não apresentavam material suficiente para a realização da imuno-histoquímica e 8 (oito) casos que, após a reação de imuno-histoquímica, estavam inadequados para leitura e determinação do escore, restando, para o presente estudo, 111 (cento e onze) casos (Figura 15).

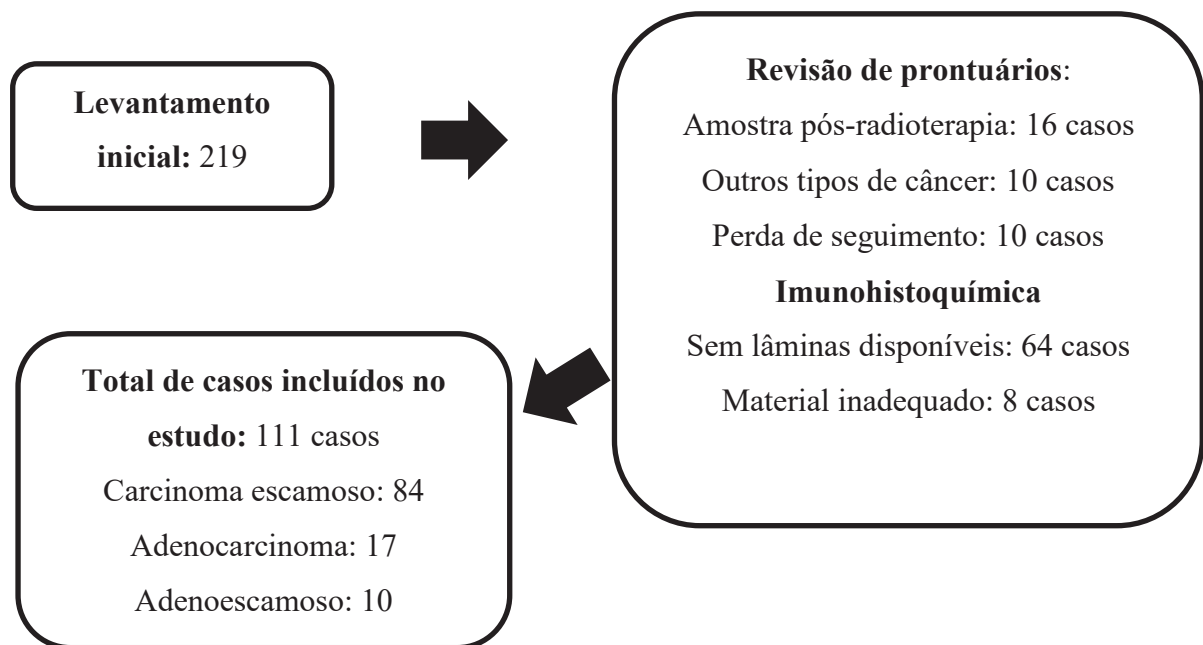


Figura 15. Fluxograma do total de amostras incluídas no estudo

4.3 Análise Imuno-histoquímica no Câncer de Colo Uterino

Para a análise imuno-histoquímica (IHQ) de Vimentina, foi utilizado o anticorpo monoclonal (anti-Vimentina, clone V9, DAKO-AGILENT, diluição 1:2) (Tabela 5).

Tabela 5. Informação sobre os anticorpos

Anticorpo	Fabricante	Clone	Recuperação Antigênica	Diluição
Anti-vimentina	Dako	V9	Panela de pressão	1:2

Em relação ao método de imunoperoxidase associada a polímeros (*Kit comercial Novolink-Novocastra Max Polymer Detection System – Leica*), foi utilizado o protocolo do Laboratório de Imuno-histoquímica do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge (Anexo A). Os cortes de câncer de colo uterino são montados em lâminas silanizadas, desparafinizadas em xilol, em temperatura controlada e depois reidratados em uma série de lavagens com álcool (100%, 80% e 50%, respectivamente). Em seguida, foram submetidos à recuperação antigênica por calor úmido, em panela de pressão elétrica, durante sete minutos, utilizando o Citrato 10mM/pH 6,0. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente para resfriamento por cerca de 20 (vinte) minutos e lavadas em tampão fosfato (PBS). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em peróxido de hidrogênio 10V a

3% durante 10 (dez) minutos e, posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS. Após o bloqueio, as lâminas foram incubadas a 4° C durante a noite, com o anticorpo primário, e, então, lavadas com PBS e incubadas por 30 (trinta) minutos com reagente pós-primário, novamente lavadas com PBS e incubadas por mais 30 (trinta) minutos com o polímero contendo cerne de dextran. Depois uma nova lavagem com água corrente e PBS, a reação foi revelada com tetra-hidroclorato de 3-3'diaminobenzidina (DAB), por 10 (dez) minutos e levemente contracorada com hematoxilina de Harris. Nesse momento, as lâminas foram desidratadas em álcool e xilol e montadas com lamínula usando Entellan Novo (Merk). Foi utilizado um corte de tecido de melanoma como controle positivo, que foi incluído em cada reação realizada (Figura 16). Todas as reações foram processadas nas mesmas condições ambientais.

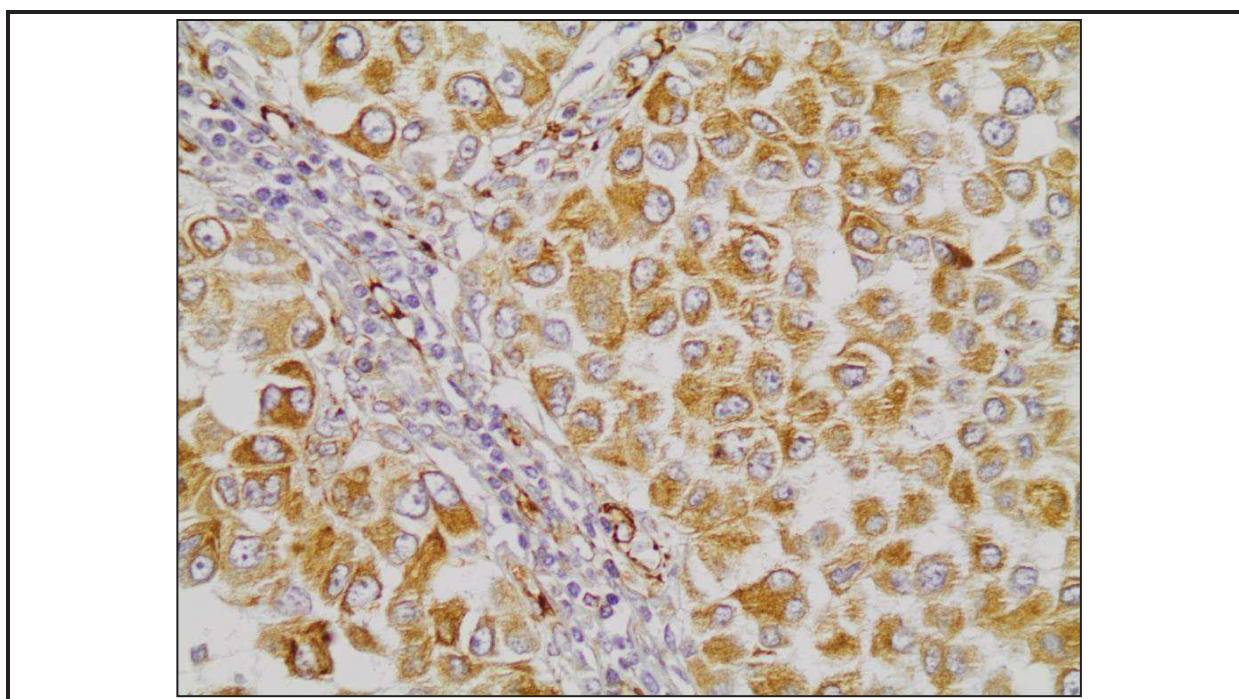


Figura 16. Imunoexpressão de Vimentina em células de melanoma humano

A expressão de Vimentina foi avaliada pela presença de grânulos marrons no citoplasma das células. O *score* final da IHQ foi calculado usando método quantitativo baseado na porcentagem de células positivas, conforme descrito por Yu et al. (2015). Três campos de alta marcação foram selecionados e considerados para a avaliação. O *score* foi baseado na porcentagem de células marcadas e dividido em: 1- quando a marcação era observada em menos de 10% das células; 2- com marcação entre 11 e 40%; 3- com marcação entre 41 e 75%; 4- com marcação $\geq 76\%$. A análise final considerou a porcentagem de células coradas, vez que todos os casos apresentaram marcação de alta intensidade.

Os *scores* de marcação de Vimentina foram dicotomizados nos espécimes de câncer do colo uterino, a fim de facilitar a análise estatística. Assim, foram considerados hipoeexpressos os casos com índices estatísticos $\leq 40\%$ (Figura 17) e hiperexpressos os casos com marcação $>40\%$ (Figura 18).

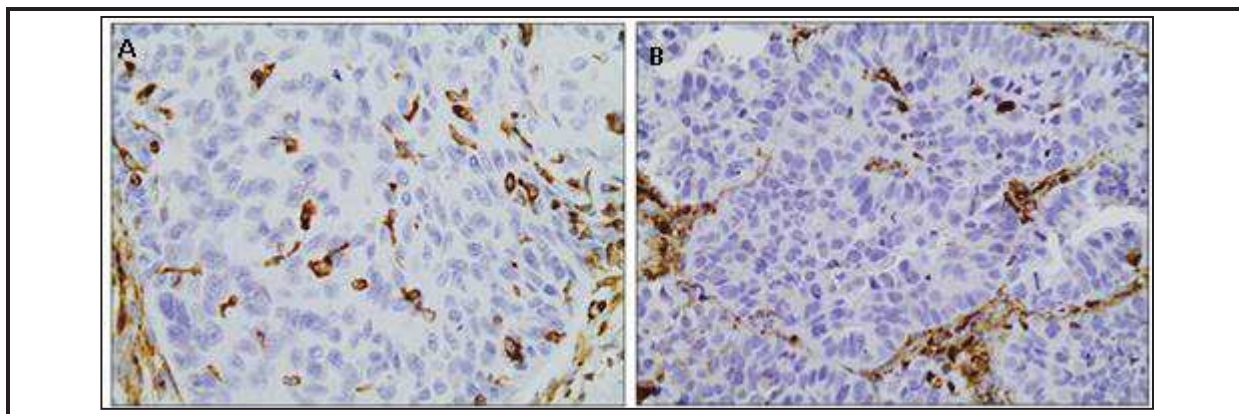


Figura 17. *Score* de expressão da Vimentina $\leq 40\%$. (A) Carcinoma escamoso. (B) Adenocarcinoma

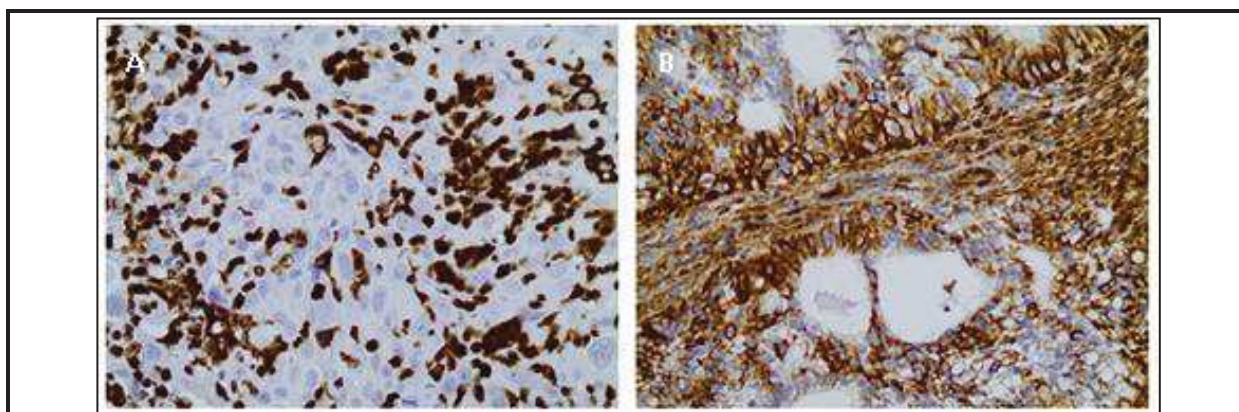


Figura 18. *Score* de expressão da Vimentina $>40\%$. (A) Carcinoma Escamoso. (B) Adenocarcinoma

4.4 Análise Estatística

Para as variáveis categóricas, foram calculadas as frequências absoluta e relativa; para as não categóricas, foram realizados cálculos de tendência central, ou seja, média e mediana, e de dispersão, como desvio padrão e coeficiente de variação. Posteriormente foram aplicados testes de associação para a realização da estatística comparativa. O teste aplicado foi o teste exato de Fisher. Finalmente, foi realizado o cálculo da sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier (KM). Os dados foram estratificados e as sobrevidas foram comparadas utilizando o método de *Log-Rank*, assumindo como significativo os *p*-valores menores que 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Grupo de estudo – aspectos sociodemográficos e clinicopatológicos

O grupo estudado incluiu 111 (cento e onze) mulheres com câncer de colo uterino com confirmação histopatológica. Os dados clínicos e sociodemográficos encontram-se descritos na Tabela 6. A idade das mulheres que compõem o grupo variou de 26 a 88 anos e a média de idade foi de 51,2 anos ($\pm 15,3$). A maioria das mulheres (77,5%) era casada ou tinha um relacionamento estável. O tabagismo foi relatado por 38,7% das mulheres e 50,5% do grupo era de mulheres menopausadas à época do diagnóstico (Tabela 6).

A maioria (61,3%) das mulheres com câncer de colo uterino foi submetida a algum tipo de cirurgia durante o tratamento, sendo a histerectomia radical o procedimento cirúrgico mais frequente. Quanto ao tratamento radioterápico, a combinação radioterapia + braquiterapia foi aplicada a 34,2% das participantes. O tratamento quimioterápico apresenta baixa efetividade terapêutica em pacientes com esse tipo de câncer, sendo usado apenas nos casos metastáticos, fato observado neste estudo em 9,9% das pacientes que apresentaram metástases à distância (13,3%) (Tabela 6).

Com relação ao tipo histológico, os carcinomas escamosos corresponderam à maioria dos casos (75,7%), seguidos pelos adenocarcinomas (15,3%) e carcinomas adenoescamosos (9,0%). Os tumores menos extensos (Tis + T1) foram os mais comuns, perfazendo 64,9% dos casos. Metástases linfonodais foram observadas em 3,6% dos casos e metástases à distância foram registradas em 9,9% dos casos. Ao final de 60 meses, o óbito foi registrado em 34,2% dos casos (Tabela 6).

Tabela 6. Características sociodemográficas e clinicopatológicas das pacientes com câncer de colo uterino

Variável	n (n=111)	f (%)
Faixa Etária		
≤ 40 anos	38	34,2
> 40 anos	73	65,8
Estado Civil		
Solteira	25	22,5
Outro	86	77,5
Tabagismo		
Sim	43	38,7
Não	57	51,4
Não informado	11	9,9
Status Menstrual		
Menacme	55	49,5
Menopausa	56	50,5

(continua)

(conclusão Tabela 6)

Variável	n (n=111)	f (%)
Tratamento Cirúrgico		
Sim	68	61,3
Não	43	38,7
Tratamento Radioterápico		
Radioterapia externa	15	13,5
Braquiterapia	1	0,9
Ambos	38	34,2
Não fez	57	51,4
Tratamento Quimioterápico		
Sim	11	9,9
Não	100	90,1
Estadiamento Clínico TNM		
Tis	4	3,6
I	63	56,8
II	16	14,4
III	11	9,9
IV	14	12,6
NA	3	2,7
Tamanho do Tumor (T)		
Tis	7	6,3
T1	65	58,6
T2	21	18,9
T3	10	9,0
T4	8	7,2
Metástase Linfonodal (N)		
N0	97	87,4
N1	4	3,6
Nx	10	9,0
Metástase à Distância (M)		
M0	99	89,2
M1	11	9,9
Mx	1	0,9
Tipo Histológico		
Ca Esamoso	84	75,7
Adenocarcinoma	17	15,3
Adenoescamoso	10	9,0
Status ou Óbito Registrado		
Viva	73	65,8
Óbito Registrado	38	34,2

5.2 Expressão de Vimentina

A expressão de Vimentina foi observada em 100% dos tumores avaliados e sua quantificação foi dicotomizada nos espécimes de carcinomas de colo uterino, com tumores que apresentaram expressão $\leq 40\%$ (hipoexpressão) e tumores com expressão $> 40\%$ (hiperexpressão). Com base nessa classificação, observou-se que 74,8% dos carcinomas do colo uterino apresentaram hipoexpressão. A expressão de Vimentina foi investigada em relação às variáveis clinicopatológicas dos tumores, incluindo tamanho, metástase linfonodal, metástase à distância, estadiamento clínico, tipo histológico e óbito registrado, entretanto, nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$) foi percebida entre as variáveis estudadas (Tabela 7).

Tabela 7. Expressão de Vimentina em relação às características clinicopatológicas dos carcinomas de colo uterino

Variável	Expressão de Vimentina				p-valor
	≤ 40% (n=83)		> 40% (n=28)		
	n	f(%)	n	f(%)	
Tamanho do Tumor (T)					
Tis + T1 + T2	70	84,3	23	82,1	0,772
T3 + T4	13	15,7	5	17,9	
Metástase Linfonodal (N)*					
N0	73	96,1	24	96,0	0,954
N1	3	3,9	1	4,0	
Metástase à Distância (M)**					
M0	74	90,2	25	89,3	0,994
M1	8	9,8	3	10,7	
Estadiamento Clínico TNM***					
Tis + I + II	62	77,5	21	75,0	0,798
III + IV	18	22,5	7	25,0	
Tipo Histológico					
Ca Esamoso	64	77,1	20	71,4	0,613
Adenocarcinoma + Adenoescamoso	19	22,9	8	28,6	
Status ou Óbito Registrado					
Viva	51	61,4	22	78,6	0,113
Óbito Registrado	32	38,6	6	21,4	

Foram excluídos: (*) 10 Nx; (**) 1 Mx; (***) 3 Não Avaliados. Teste utilizado: Teste Exato de Fisher.

5.3 Aspectos Prognósticos e Sobrevida

Dentre as 111 pacientes com carcinoma de colo uterino estudadas, 38 delas (34,2%) evoluíram a óbito em um período de seguimento de 60 meses. A sobrevida global para o grupo estudado foi de 65,8% (Figura 19).

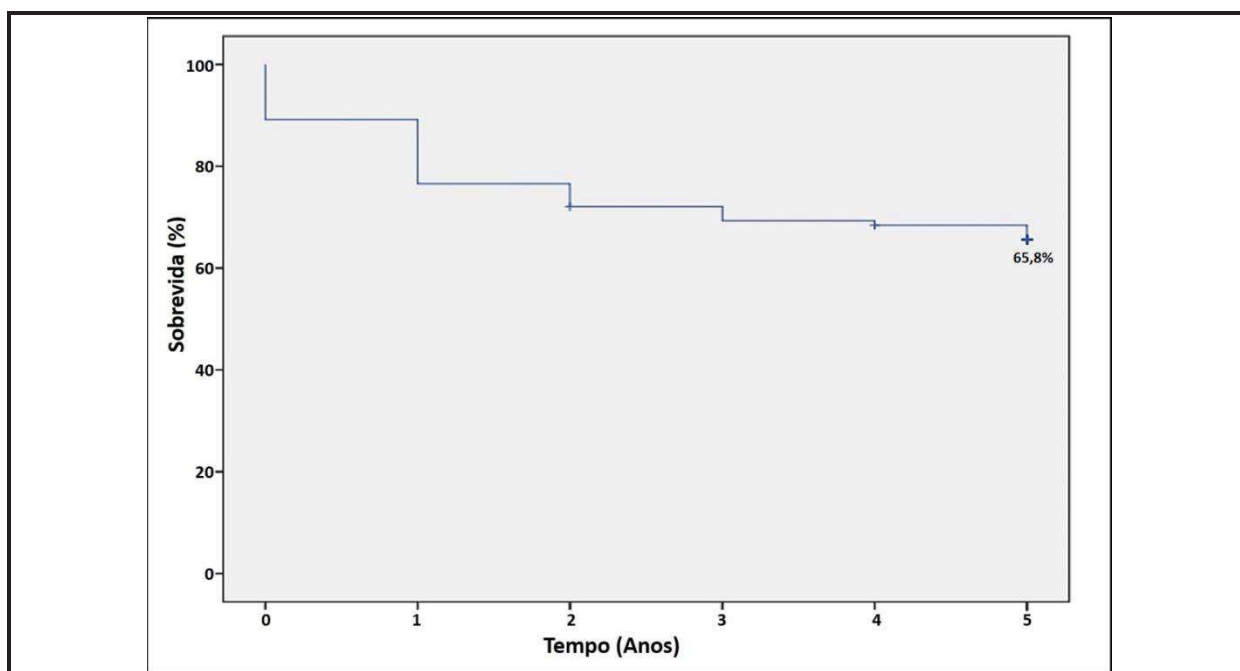


Figura 19. Sobrevida global para as pacientes estudadas com câncer de colo uterino

Quando ajustada em relação à idade, a sobrevida foi maior (83,9%) para pacientes com ≤ 50 anos comparadas às pacientes com mais de 50 anos (47,3%) ($p=0,0001$) (Figura 20).

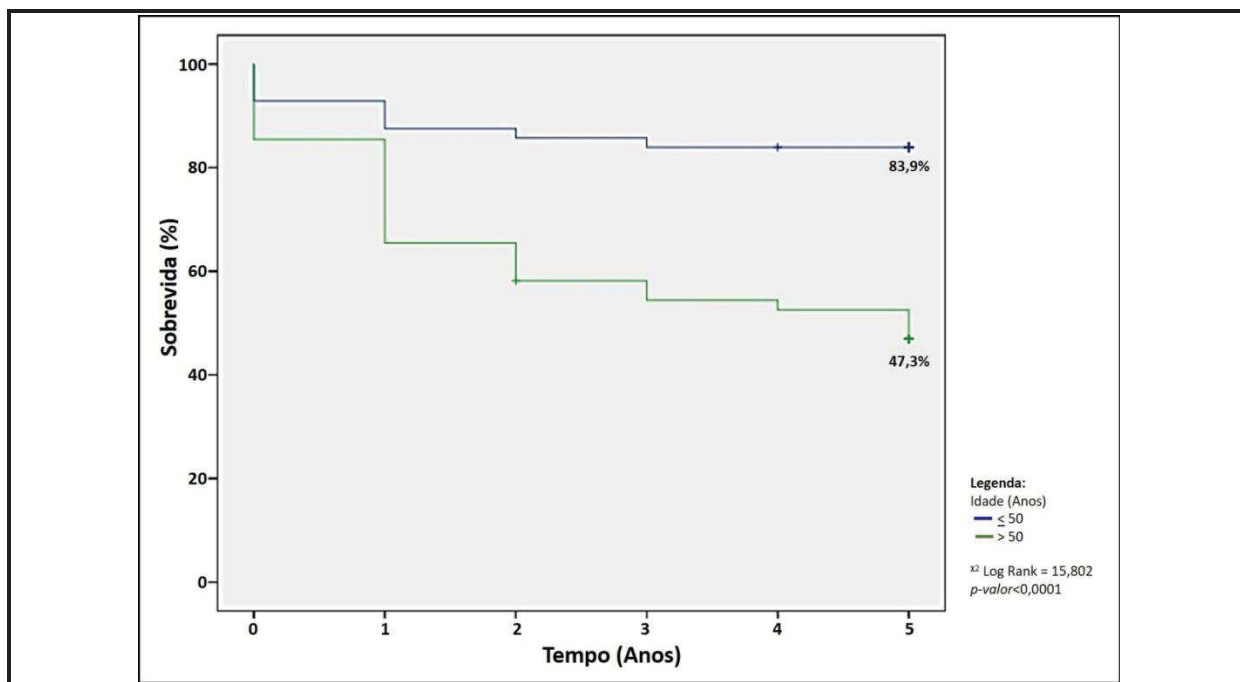


Figura 20. Sobrevida em cinco anos para as pacientes com câncer de colo uterino em função da idade

Em relação ao tipo histológico, a sobrevida não variou para as pacientes com carcinomas escamosos (66,7%), tampouco para as com adenocarcinomas e carcinomas adenoescamosos (63%) ($p=0,585$) (Figura 21).

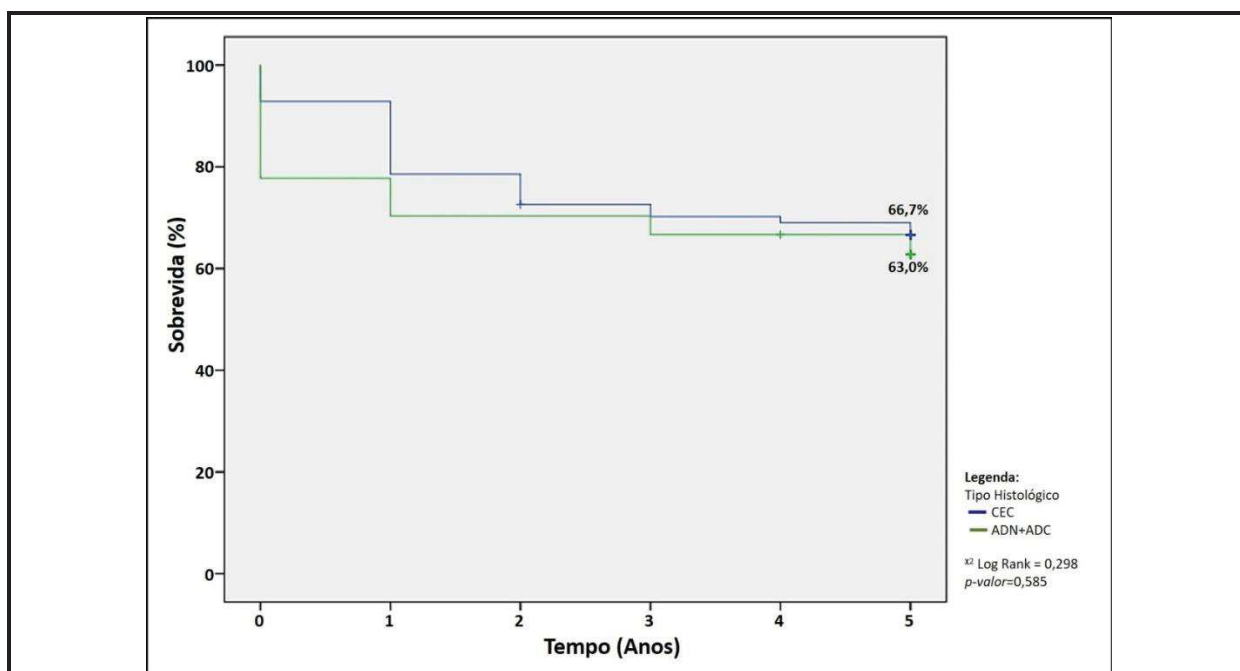


Figura 21. Sobrevida em cinco anos para as pacientes com câncer de colo uterino em função do tipo histológico

Em relação à extensão da lesão, a sobrevida foi maior (76,3%) para as pacientes que apresentavam tumores menores (Tis, T1, T2) e menor (11,1%) para as pacientes com tumores maiores (T3 e T4) ($p=0,0001$) (Figura 22).

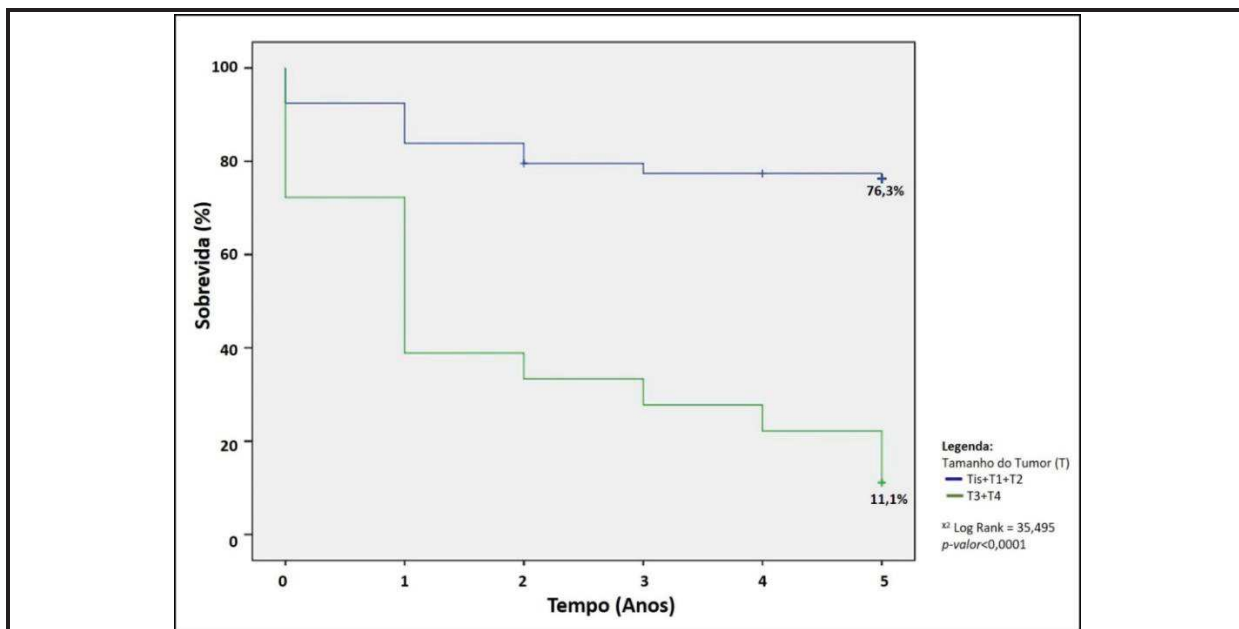


Figura 22. Sobrevida em cinco anos para as pacientes com câncer de colo uterino em função da extensão da lesão

A respeito da presença de metástase linfonodal, a sobrevida foi maior (75,3%) para as pacientes com tumores não metastáticos comparadas àquelas com metástase linfonodal que evoluíram para óbito no período avaliado ($p<0,0001$) (Figura 23).

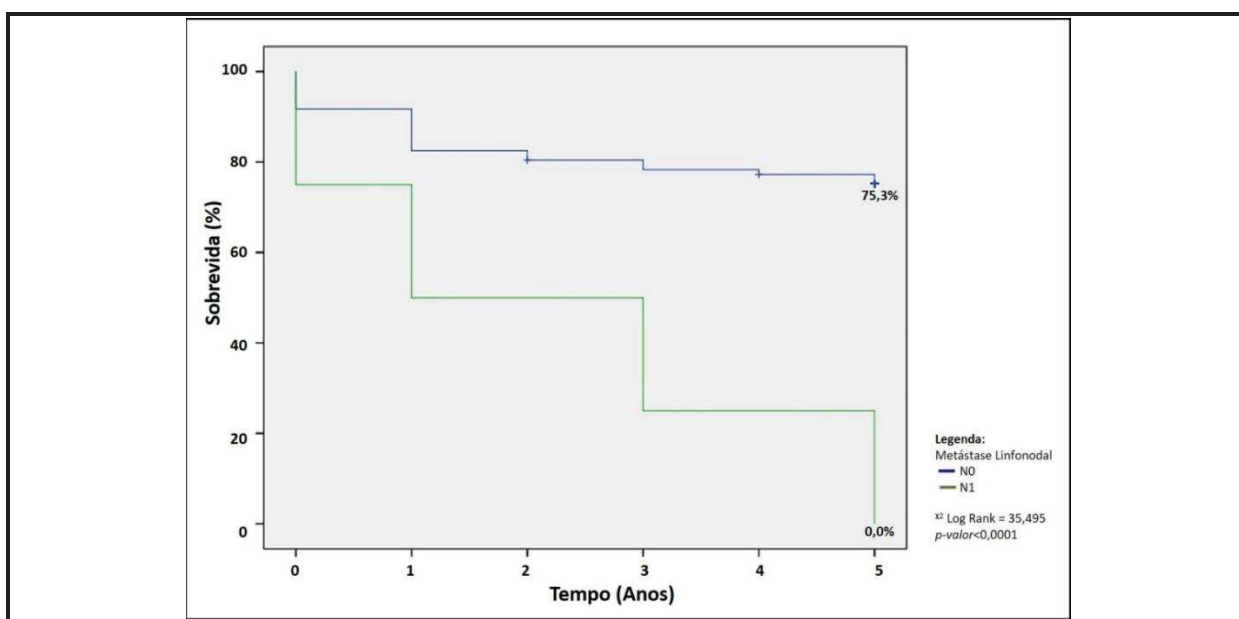


Figura 23. Sobrevida em cinco anos para as pacientes com câncer de colo uterino em função da presença de metástase linfonodal

Em se tratando da presença de metástase à distância, a sobrevida foi maior (73,7%) para as pacientes com tumores não metastáticos e todas aquelas com metástase à distância foram a óbito no período avaliado ($p < 0,0001$) (Figura 24).

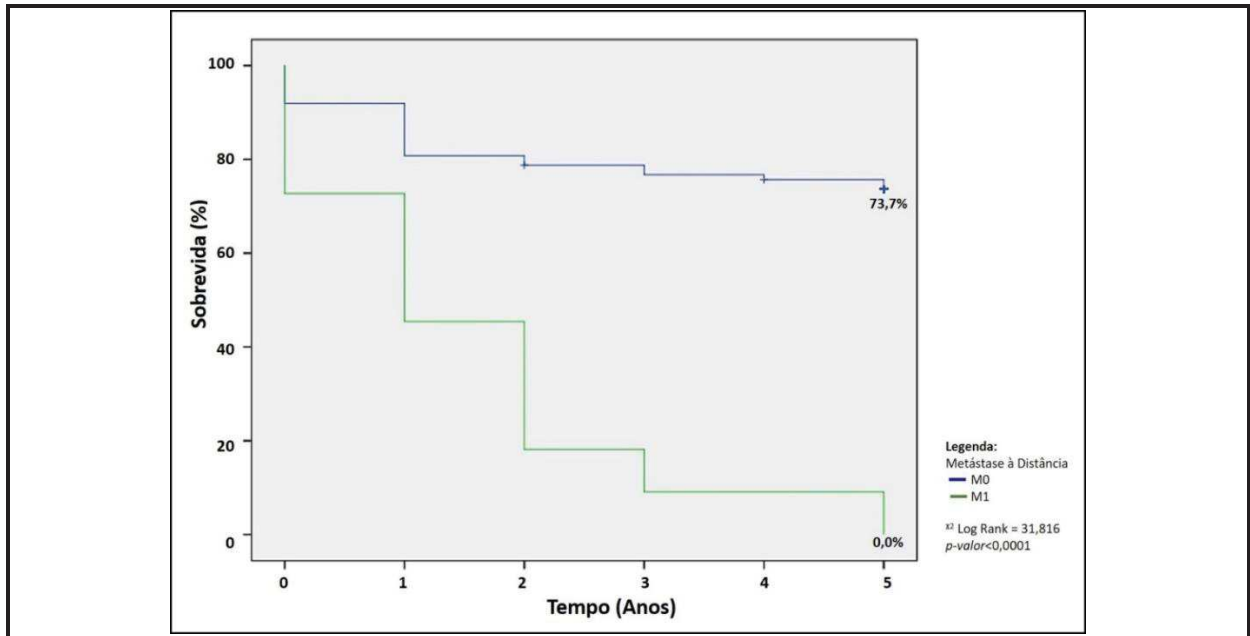


Figura 24. Sobrevida em cinco anos para as pacientes com carcinoma de colo uterino em função da presença de metástase à distância

Em relação ao estadiamento TNM, a sobrevida foi maior (80,7%) para as pacientes com estágio menos avançado (Tis, TI e TII), comparadas àquelas com estadiamento mais avançado (TIII e TIV), que foi de 12% ($p < 0,0001$) (Figura 25).

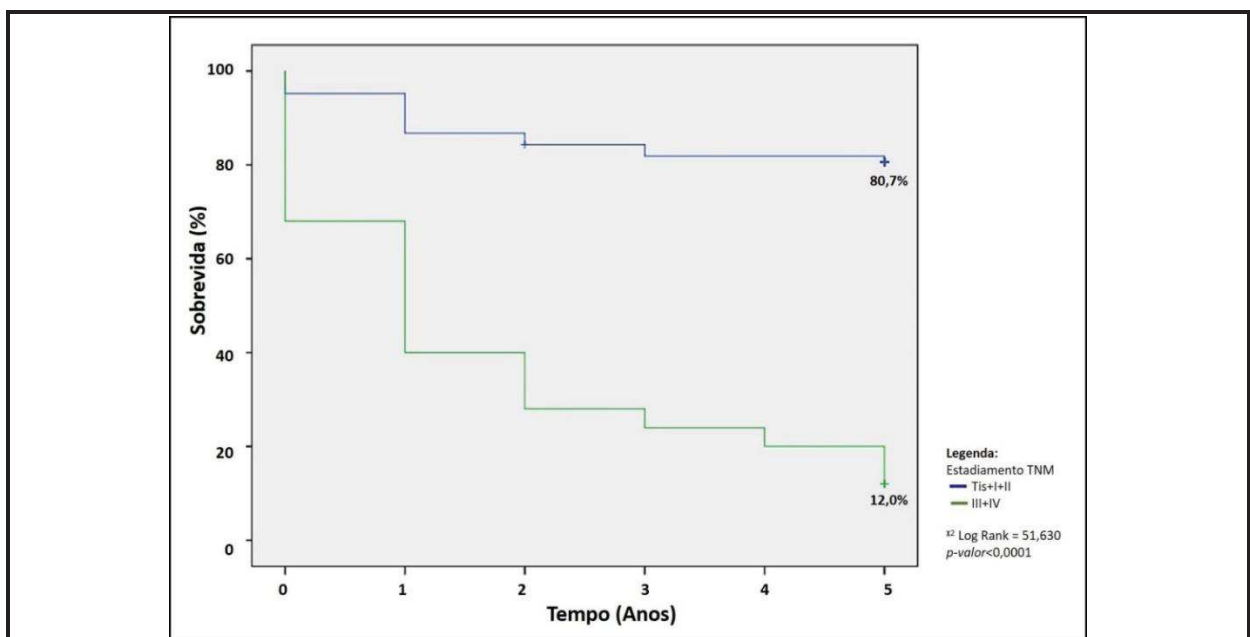


Figura 25. Sobrevida em cinco anos para as pacientes com carcinoma de colo uterino em função do estadiamento TNM

Sobre a expressão de Vimentina, a sobrevida foi de 61,4% para as pacientes com hipoexpressão e para as com hiperexpressão foi 78,6%. Não houve diferença entre os grupos ($p=0,105$) (Figura 26).

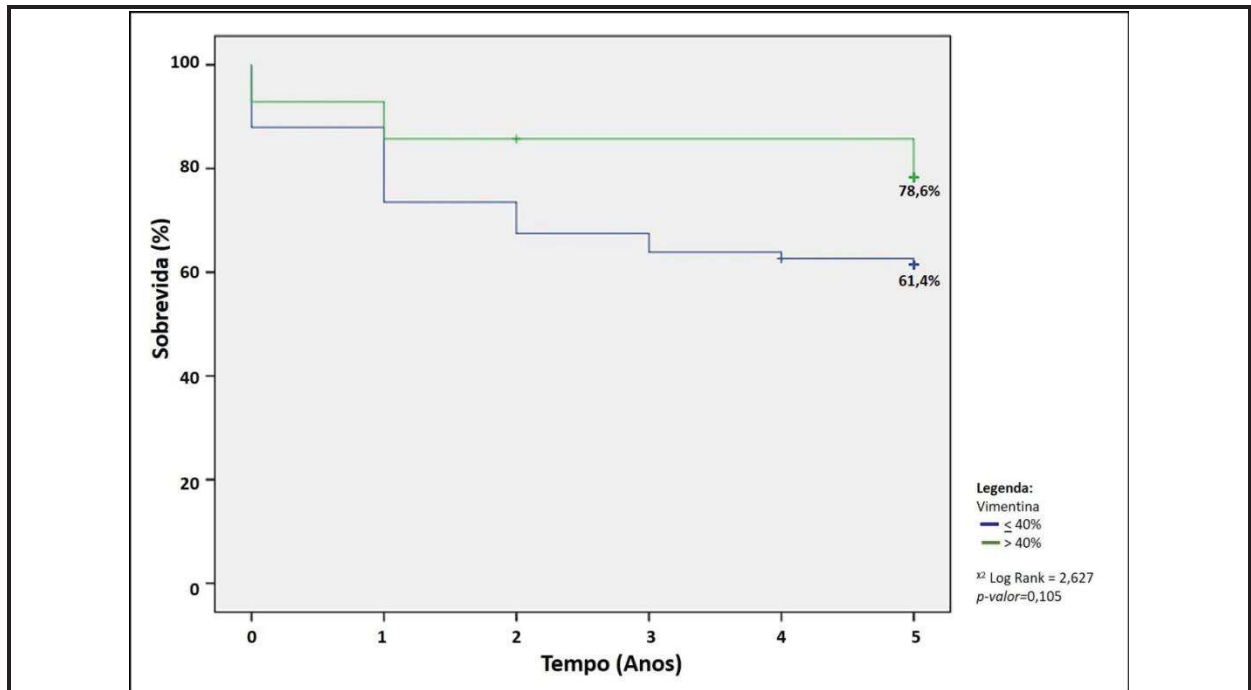


Figura 26. Sobrevida em cinco anos para as pacientes com carcinoma de colo uterino em função da expressão de Vimentina

6 DISCUSSÃO

A invasão tumoral e o desenvolvimento de metástases são etapas cruciais durante a progressão do processo de carcinogênese. Nos carcinomas, a disseminação das células tumorais inclui eventos como a migração de células epiteliais para sítios adjacentes e à distância, o intravasamento das células tumorais para o interior de vasos linfáticos e sanguíneos, a sobrevivência dessas células no sistema circulatório, o deslocamento e o extravasamento das células tumorais através da parede dos vasos e a formação de colônias e micrometástases, que podem evoluir para lesões metastáticas. A transição epitélio-mesênquima é um processo importante para a compleição das fases de invasão e metástase e vem sendo amplamente estudado em diferentes tumores (DU et al., 2018; FIGIEL et al., 2017; HOLTHOFF et al., 2016; ZHAO et al., 2014).

Nos carcinomas, durante a transição epitélio-mesênquima, as células epiteliais compartilham funções das células adjacentes do tecido conjuntivo e adquirem mobilidade e capacidade de migração para sítios próximos e à distância. A transição epitélio-mesênquima consiste em vários fenômenos de reprogramação da expressão gênica, capazes de modificar o perfil de biomarcadores das células tumorais (BRABLETZ et al., 2018). Uma dessas mudanças consiste na expressão aberrante de Vimentina pelas células epiteliais tumorais. Nesse sentido, o papel prognóstico da expressão de Vimentina tem sido avaliado em vários carcinomas humanos (DU et al., 2018; YAMASHITA et al., 2013; ZHAO et al., 2014).

A respeito do câncer de colo uterino, ainda são escassos os estudos que avaliaram a associação da expressão de Vimentina com aspectos prognósticos dos tumores, especialmente com relação às avaliações da sobrevida e do intervalo livre de recidiva (CHENG et al., 2012; GILLES et al., 1996; HUSAIN et al., 2016; LIN et al., 2017; YU et al., 2015). O presente estudo investigou a expressão de Vimentina em 111 casos de câncer de colo uterino, utilizando a imuno-histoquímica. De forma singular, essa expressão foi observada em 100% dos espécimes tumorais cervicais estudados, confirmando a expressão aberrante dessa proteína tanto em carcinomas escamosos como em adenocarcinomas e carcinomas adenoescamos do colo uterino, mas normalmente não é encontrada nas células epiteliais cervicais não tumorais, e sim somente nas mesenquimais (PATTABIRAMAN; WEIMBERG, 2016; SATELI; LI, 2011).

A hipótese inicial deste estudo era a de que a hiperexpressão de Vimentina estaria associada aos fatores de pior prognóstico no câncer de colo uterino e, conseqüentemente, à menor sobrevida das pacientes. Após a investigação das possíveis associações entre a expressão

de Vimentina e os fatores prognósticos clássicos para o tipo de câncer aqui analisado, bem como com a sobrevida das pacientes, essa hipótese não foi confirmada. Desse modo, estes resultados divergem daqueles relatados em estudos prévios e isso pode ter se dado em virtude de os objetivos e as metodologias utilizadas nessas pesquisas serem bem diferentes.

A associação entre a expressão de Vimentina e as propriedades invasivas câncer de colo uterino foi inicialmente estudada em modelos de linhagens celulares cervicais transformadas pelo HPV (GILLES et al., 1994a, 1994b). A associação entre expressão de Vimentina e a invasão tumoral, foi relatada comparando a expressão de Vimentina por imuno-histoquímica em casos de carcinomas cervicais *in situ* e em carcinomas cervicais invasores. Esse mesmo estudo avaliou lesões metastáticas de carcinomas cervicais e demonstrou a expressão de Vimentina em metástases, porém em menor intensidade (GILLES et al., 1996).

Um estudo avaliou 135 pacientes com carcinoma escamoso de colo uterino em estágio I e II. Esse grupo utilizou um anticorpo antivimentina da *Zymed Laboratories* e 65% dos casos foram positivos para expressão de Vimentina. Esta foi inversamente associada com a diferenciação histológica dos tumores, a presença de metástase linfonodal e a recorrência do câncer. Em análise uni e multivariada, a hiperexpressão de Vimentina (acima de 80% das células marcadas) foi considerada um fator de pior prognóstico, vez que esteve significativamente associada a menor sobrevida das pacientes com carcinoma de células escamosas do colo do útero (CHENG et al., 2012). Entretanto, o estudo não avaliou tumores mais avançados em estádios III e IV.

Proteínas relacionadas com a transição epitélio-mesênquima, incluindo a Vimentina, foram avaliadas em carcinomas *in situ* (81 casos), carcinomas de células escamosas microinvasores (17 casos) e invasores (21 casos), a fim de demonstrar seus papéis-chave na progressão dos tumores. O estudo foi realizado em blocos de parafina incluídos em um microarranjo e a expressão de Vimentina detectada pelo anticorpo V9 (BioGenex), tendo sido mais alta nos carcinomas microinvasores e invasores quando comparados com os carcinomas *in situ*; entretanto, os aspectos clínicos patológicos e prognósticos não foram avaliados no estudo (MYONG, 2012).

Um estudo de caso-controle comparou a expressão de Vimentina com as características clinicopatológicas dos tumores, incluindo o grau tumoral e a idade das pacientes com câncer de colo uterino. A expressão citoplasmática de Vimentina foi observada em 40% dos casos e foi negativa em lesões inflamatórias benignas não tumorais do colo do útero. A expressão de Vimentina foi significativamente associada com grau do tumor e não variou em função das

diferentes faixas etárias. Os resultados demonstraram um possível papel de vimentina no desenvolvimento e na progressão do câncer de colo uterino, contudo, outros aspectos clinicopatológicos e prognósticos não foram investigados no estudo (HUSAIN et al., 2016).

Um estudo investigou o valor prognóstico da expressão de Vimentina no câncer de colo uterino associando-a aos fatores clinicopatológicos e correlacionando a outros marcadores, como o TP53, e com metodologias além da imuno-histoquímica. O *score* utilizado pelos autores foi de 10%, considerando hipoexpressão abaixo de 10% e hiperexpressão acima de 10%, sendo utilizado o anticorpo monoclonal de rato (DAKO, Denmark, diluição 1: 200). Diferentemente deste estudo, os autores avaliaram 130 espécimes de câncer de colo uterino obtidos de procedimentos cirúrgicos de mulheres com câncer apenas em estadiamento I e II. Esta pesquisa aqui apresentada também realizou uma investigação em estadiamentos mais avançados, III e IV. Lin et al. (2017) observaram associação da hiperexpressão da vimentina com idade, metástases linfonodais e invasão linfática.

Apesar dos estudos acima terem investigado a expressão de Vimentina utilizando imuno-histoquímica, os resultados diferem entre eles e também distintas são as metodologias. Hussain et al. (2016) e Yu et al. (2015) encontraram associação entre grau histológico, mas não com a idade. Por sua vez, Lin et al. (2017) não encontraram associação com o grau histológico, e sim com a idade; ainda, encontraram associação com metástase linfonodal e à distância e não com tamanho do tumor e estadiamento. Neste estudo em questão, tampouco foi encontrada associação com tamanho do tumor e estadiamento.

Várias diferenças podem ser apontadas entre este estudo e os demais. Em primeiro lugar, os anticorpos primários antivimentina diversos que são usados em cada um. Em segundo lugar, os procedimentos de avaliação microscópica da expressão de Vimentina e os pontos de corte usados para definir a hipo e a hiperexpressão desse biomarcador. O método de imuno-histoquímica é relativamente simples, mas apresenta particularidades que podem influenciar os resultados, incluindo o tempo de fixação do espécime tumoral, o método de recuperação antigênica e a escolha dos anticorpos e do reagente utilizados.

A análise da expressão de Vimentina por imuno-histoquímica é amplamente utilizada, no entanto, apresenta muitos desafios e dificuldades, incluindo a reprodutibilidade (KOSTI et al., 2016), a falta de padronização no que se refere ao tipo de anticorpo utilizado e a forma de avaliação microscópica da marcação tecidual. Toda essa variabilidade pode ter influenciado a diversidade de resultados encontrada nos estudos disponíveis. Além disso, este estudo incluiu os diferentes tipos histológicos de câncer do colo uterino e diferentes estádios clínicos, o que

pode ter dificultado a detecção de possíveis associações entre a expressão de Vimentina e o prognóstico desses tumores.

Um aspecto importante a ser considerado é a ausência de padronização dos métodos semiquantitativos de avaliação e os diferentes pontos de corte usados para definir hipoexpressão ou hiperexpressão de Vimentina nos estudos (CHENG et al., 2012; HUSAIN et al., 2015; LIN et al., 2017; YU et al., 2015). Neste estudo, foram utilizados os critérios de Yu et al. (2015), que consideram o índice e a intensidade da marcação, entretanto, há de se ressaltar que todas as amostras apresentaram alta intensidade de marcação e para a análise estatística dos resultados os índices de marcação foram dicotomizados e considerou-se hipoexpressão quando o índice era menor ou igual a 40% e hiperexpressão, quando acima de 40%. Porém, ao utilizar esse ponto de corte nenhuma associação significativa foi observada entre a expressão de Vimentina e os parâmetros clinicopatológicos e prognósticos dos casos analisados.

A sobrevida global do grupo de pacientes estudado foi de 65,8%, semelhante a outros estudos avaliados em regiões brasileiras nesse mesmo período (ALVES et al., 2017; MASCARELLO; ZANDONADE; AMORIM, 2013). Apesar de não ter sido influenciada pela expressão de Vimentina, a sobrevida foi associada aos fatores prognósticos clássicos como tamanho do tumor ($p < 0,0001$), metástase linfonodal ($p < 0,0001$), metástase à distância ($p < 0,0001$) e estadiamento clínico ($p < 0,0001$), fato que valida a casuística e os dados coletados.

Apesar dos resultados não terem demonstrado associações significativas entre a expressão de Vimentina e os fatores prognósticos dos carcinomas de colo uterino, a expressão aberrante de Vimentina em todos os casos de câncer de colo uterino estudadas foi observada, incluindo carcinomas escamosos, adenocarcinomas e carcinomas adenoescamosos, caracterizando o processo de transição epitélio-mesênquima nesses tumores, bem como o potencial de invasão e metástase desse tipo de câncer (PATTABIRAMAN; WEIMBERG, 2016; SATELI; LI, 2011).

Alguns autores sugerem que o mecanismo da TEM apresenta estados intermediários no que diz respeito à mudança do fenótipo epitelial para o fenótipo mesenquimal invasor e que a expressão de Vimentina somente não deve ser considerada como biomarcador do programa da TEM. Essa observação representa uma importante limitação deste estudo. A diminuição da expressão de E-caderinas e a expressão dos principais fatores de transcrição da TEM, como Snail, Twist e ZEB-1, podem trazer informações importantes no sentido de estabelecer a relação

entre o prognóstico do câncer de colo uterino e a TEM (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEIMBERG, 2017) e devem ser incluídos em futuras avaliações.

Os resultados apresentados neste estudo confirmam a expressão aberrante da Vimentina no câncer de colo uterino, sugerindo a importância do programa de transição epitélio-mesênquima nesses tumores, porém, não foi capaz de demonstrar o papel da hiperexpressão da Vimentina no prognóstico desse tipo de câncer.

7 CONCLUSÕES

- (1) A expressão aberrante de Vimentina foi observada em todos os casos de câncer de colo uterino avaliados.
- (2) A expressão de Vimentina não foi associada às características clinicopatológicas dos casos de câncer de colo uterino analisados neste estudo.
- (3) A sobrevida global em sessenta meses para as pacientes avaliadas com câncer de colo uterino foi de 65,8% e foi influenciada por idade, tamanho ou extensão do tumor, presença de metástases linfonodais, presença de metástases à distância e estadiamento dos tumores.
- (4) A sobrevida em sessenta meses para as pacientes estudadas não foi associada à expressão de Vimentina, logo, esta não foi considerada um biomarcador prognóstico para os casos de câncer de colo uterino avaliados neste estudo.

8 REFERÊNCIAS

- ALMONTE, M. et al. 2011. **Risk factors for high-risk human papillomavirus infection and cofactors for high-grade cervical disease in Peru.** *International Journal of Gynecological Cancer*, v. 21, n. 9, p. 1654-1663.
- ALVES, José Vargas et al. 2017. **Assessment of survival in patients with cervical cancer in a hospital based cohort in Southern Brazil.** *Brazilian Journal Of Oncology*, v. 13, n. 46, p. 1-7.
- AMIN, M. B. et al. 2017. **The Eighth Edition AJCC Cancer staging manual: continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging.** *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 67, n. 2, p. 93-99.
- AMORIM, A. T. et al. 2017. **Co-infection of sexually transmitted pathogens and Human Papillomavirus in cervical samples of women of Brazil.** *BMC Infectious Diseases*, v. 17, n. 1, p. 1-12.
- ANAPAT. **Atlas de Anatomia Patológica.** 2016. *Universidade Estadual de Campinas - Unicamp.* Disponível em> <http://anatpat.unicamp.br/indexalfa.html>. Acesso em Abril, 2018.
- BANYARD, J.; BIELENBERG, D. R. 2015. **The role of EMT and MET in cancer dissemination.** *HHS Public Access*, v. 56, n. 5, p. 403-413.
- BODILY, J.; LAIMINS, L. 2011. **Persistence of human papillomavirus infections: keys to malignant progression.** *Trends in Microbiology*, v. 19, n. 1, p. 33-39.
- BRABLETZ, T. et al. 2018. **EMT in cancer.** *Nature Reviews Cancer*, v. 18, n. 2, p. 128-134.
- BRAWNER, B. M. et al. 2013. **The development of a culturally relevant, theoretically driven HPV prevention intervention for urban adolescent females and their parents/guardians.** *Health Promotion Practice*, v. 14, n. 4, p. 624-636.
- CANCER RESEARCH PRODUCT GUIDE, edition 3, 2015.
- CASTELLSAGUE, X. C. et al. 2002. **Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners.** *The New England Journal of Medicine*, v. 346, n. 15, p. 1105-1112.
- CASTELLSAGUÉ, X. 2008. **Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer.** *Gynecologic Oncology*, v. 110, n. 3, p. S4-S7.
- CHEN, C. et al. 2012. **Accuracy of several cervical screening strategies for early detection of cervical cancer: a meta-analysis.** *International Journal of Gynecological Cancer*, v. 22, n. 6, p. 908-921.
- CHENG, Y. et al. 2012. **Significance of E-cadherin, β -catenin, and vimentin expression as postoperative prognosis indicators in cervical squamous cell carcinoma.** *Human pathology*, v. 43, n. 8, p. 1213-1220.

- CLIFFORD, G. et al. 2006. **HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases.** *Vaccine*, v. 24, n. SUPPL. 3, p. 26-34.
- CLIFFORD, G. M.; TULLY, S.; FRANCESCHI, S. 2017. **Carcinogenicity of Human Papillomavirus (HPV) types in HIV-positive women: a meta-analysis from HPV infection to cervical cancer.** *Clinical Infectious Disease*, v. 64, n. 9, p. 1228-1235.
- CORRÊA, C. et al. 2017. **Rastreamento do câncer do colo do útero em Minas Gerais: avaliação a partir de dados do Sistema de Informação do Câncer do Colo do Útero (SISCOLO).** *Cadernos Saúde Coletiva*, v. 25, n. 3, p. 315-323.
- DAVE, J.; BAYLESS, K. 2014. **Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting.** *Microcirculation* (New York, N.Y. : 1994), v. 21, n. 4, p. 333-344.
- DENNY, L.; QUINN, M.; SANKARANARAYANAN, R. 2006. **Screening for cervical cancer in developing countries.** *Vaccine*, v. 24, n. Suppl. 3, p. 71-77.
- DO NASCIMENTO, M.; SILVA, G. 2015. **Waiting time for radiotherapy in women with cervical cancer.** *Revista de Saúde Pública*, v. 49, p. 92.
- DOORBAR, J. 2006. **Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer.** *Clinical Science*, v. 110, n. 5, p. 525-541.
- DOORBAR, J. et al. 2012. **The biology and life-cycle of human papillomaviruses.** *Vaccine*, v. 30, n. SUPPL.5, p. F55-F70.
- DOORBAR, J.; NAGAYASU, E.; GRIFFIN, C. 2015. **Human papillomavirus molecular biology and disease association.** *Reviews in Medical Virology*, v. 25, n. 1, p. 2-23.
- DOS SANTOS, G. et al. 2015. **Vimentin regulates activation of the NLRP3 inflammasome.** *Nature communications*, v. 6, p. 6574.
- DU, L. et al. 2018. **High Vimentin expression predicts a poor prognosis and progression in colorectal cancer: a study with meta-analysis and TCGA database.** *BioMed Research International*, v. 2018.
- DUTSCH-WICHEREK, M. 2010. **RCAS1, MT, and vimentin as potential markers of tumor microenvironment remodeling.** *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 63, n. 3, p. 181-188.
- EGAWA, N.; DOORBAR, J. 2017. **The low-risk papillomaviruses.** *Virus Research*, v. 231, p. 119-127.
- FILHO, A. 2009. **Emprego dos marcadores de prognóstico no tratamento para o carcinoma invasor de colo.** *Revista Brasileira de Ginecologia Obstetrícia*, v. 31, n. 9, p. 468-73, 2009.
- FIGIEL, S. et al. 2017. **Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition markers in prostate cancer.** *Human Pathology*, v. 61, p. 26-32.

GILLES, C. et al. 1994a. **Differentiation ability and oncogenic potential of HPV-33-and HPV-33+ ras-transfected keratinocytes.** *International Journal of Cancer*, v. 58, n. 6, p. 847-854.

GILLES, C. et al. 1994b. **Epithelial-to-mesenchymal transition in HPV-33-transfected cervical keratinocytes is associated with increased invasiveness and expression of gelatinase A.** *International Journal of Cancer*, v. 59, n. 5, p. 661-666.

GILLES, C. et al. 1996. **Vimentin expression in cervical carcinomas: Association with invasive and migratory potential.** *Journal of Pathology*, v. 180, n. 2, p. 175-180.

GININDZA, T. G. et al. 2017. **Prevalence of and Associated Risk Factors for High Risk Human Papillomavirus among Sexually Active Women, Swaziland.** *PLoS One*, v. 12, n. 1, p. e0170189.

GUO, M. et al. 2013. **The role of vimentin intermediate filaments in cortical and cytoplasmic mechanics.** *Biophysical Journal*, v. 105, n. 7, p. 1562-1568.

GUPTA, S.; KUMAR, P.; DAS, B. 2018. **HPV: Molecular Pathways and Targets.** *Current Problems in Cancer*, v. 42, n. 2, p. 161-174.

HALL, J.; GUYTON, A. **Tratado de fisiologia médica.** 12^a Edição. Elsevier, 2011.

HANDRA-LUCA, A. et al. 2011. **Tumour epithelial vimentin expression and outcome of pancreatic ductal adenocarcinomas.** *British Journal of Cancer*, v. 104, n. 8, p. 1296-1302.

HEISE, A.; LIMA, A. 2016. **Citopatologia convencional e citologia em meio líquido: uma revisão integrativa.** *Revista Saúde e Desenvolvimento*, v. 10, n. 5, p. 208-221.

HERFS, M. et al. 2012. **A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 26, p. 10516-10521.

HOWIE, H.; KATZENELLENBOGEN, R.; GALLOWAY, D. 2010. **Papillomavirus E6 proteins.** *Virology Journal*, v. 384, n. 2, p. 324-334.

HOLTHOFF, E. et al. 2016. **Pathologic features of aggressive vulvar carcinoma are associated with epithelial-mesenchymal transition.** *Human Pathology*, v. 56, p. 22-30.

HUANG, R; ROFSTAD, E. 2017. **Cancer stem cells (CSCs), cervical CSCs and targeted therapies.** *Oncotarget*, v. 8, n. 21, p. 35351-35367.

HUSAIN, N. et al. 2016. **Clinicopathological significance of Vimentin and Cytokeratin protein in the genesis of squamous cell carcinoma of cervix.** *Obstetrics and Gynecology International*, v. 2016, p. 5.

HUSAIN, R.; RAMAKRISHNAN, V. 2015. **Global variation of human Papillomavirus genotypes and selected genes involved in cervical malignancies.** *Annals of Global Health*, v. 81, n. 5, p. 675-683.

IARC - International Agency for Research on Cancer et al. 2012. **Cervical cancer estimated incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012**. World Health Organization, 2012.

_____. Digital atlas - **Who histological classification of tumours of the uterine cervix**. 2018. Disponível em: <<http://screening.iarc.fr/atlasclassifw ho.php?lang=1>>. Acesso em: abril 2016.

IDOWU, A. et al. 2016. **Determinants of cervical cancer screening uptake among women in Ilorin, North Central Nigeria: a community-based study**. *Journal of Cancer Epidemiology*, v. 2016, n. 6469240, p. 1-8.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Diretrizes para o rastreamento do câncer do colo do útero**. Rio de Janeiro: Inca, 2011.

_____. **Diretrizes para o rastreamento do câncer do colo do útero**. Rio de Janeiro, 2016.

_____. **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2018**. Rio de Janeiro: Inca, 2017.

_____. **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2018**. Rio de Janeiro: Inca, 2018.

IVASKA, J. et al. 2005. **PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility**. *The EMBO journal*, v. 24, n. 22, p. 3834–3845.

JIN, H. et al. 2010. **Vimentin expression of esophageal squamous cell carcinoma and its aggressive potential for lymph node metastasis**. *Biomedical research (Tokyo, Japan)*, v. 31, n. 2, p. 105-112.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. 2009. **Review series the basics of epithelial-mesenchymal transition**. *Journal of Clinical Investigation*, v. 119, n. 6, p. 1420-1428.

KANTHIYA, K et al. 2016. **Expression of p16 and Ki67 in cervical squamous intraepithelial lesions and cancer**. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 17, n. 7, p. 3201-3206.

KIDD, M.; SHUMAKER, D.; RIDGE, K. 2014. **The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer**. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 50, n. 1, p. 1-6.

KIM, Yi-Jun et al. 2015. **Prognostic analysis of uterine cervical cancer treated with postoperative radiotherapy: importance of positive or close parametrial resection margin**. *Radiation Oncology Journal*, v. 33, n. 2, p. 109.

KIM, J. et al. 2016a. **Vimentin filaments regulate integrin-ligand interactions by binding to the cytoplasmic tail of integrin $\beta 3$** . *Journal of Cell Science*, v. 129, n. 10, p. 2030-2042.

KIM, J. et al. 2016b. **Vimentin filament controls integrin $\alpha 5 \beta 1$ -mediated cell adhesion by binding to integrin through its Ser38 residue**. *FEBS letters*, v. 590, n. 20, p. 3517-3525.

KING, A. M. Q. et al. 2018. **Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2018).** *Archives of Virology*, v. 163, n. 9, p. 2601-2631.

KOSTI, I. et al. 2016. **Cross-tissue analysis of gene and protein expression in normal and cancer tissues.** *Scientific reports*, v. 6.

KRISHNAPPA, P. et al. 2014. **Expression of P16 in high-risk human papillomavirus related lesions of the uterine cervix in a government hospital, Malaysia.** *Diagnostic Pathology*, v. 19, n. 1, p. 1-6.

KYUNG, M. et al. 2015. **Tumor size and lymph node status determined by imaging are reliable factors for predicting advanced cervical cancer prognosis.** *Oncology Letters*, v. 9, n. 5, p. 2218-2224.

LAMBERT, A.; PATTABIRAMAN, D.; WEINBERG, R. 2017. **Emerging Biological Principles of Metastasis.** *Cell*, v. 168, n. 4, p. 670-691.

LEE, M.-Y. et al. 2008. **Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation.** *Clinical Cancer Research*, v. 14, n. 15, p. 4743-4750.

LEE, K. et al. 2012. **Matrix compliance regulates Rac1b localization, NADPH oxidase assembly, and epithelial-mesenchymal transition.** *Molecular Biology of the Cell*, v. 23, n. 20, p. 4097-4108.

LEVIN, C. et al. 2013. **Delivery cost of human papillomavirus vaccination of young adolescent girls in Peru, Uganda and Viet Nam.** *Bulletin of the World Health Organization*, v. 91, n. 8, p. 585-592.

LI, M. et al. 2010. **A novel function for vimentin: the potential biomarker for predicting melanoma hematogenous metastasis.** *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, v. 29, p. 109.

LI, Y. et al. 2012. **Matrix metalloproteinase-9 is a prognostic marker for patients with cervical cancer.** *Medical Oncology*, v. 29, n. 5, p. 3394-3399.

LIAN, N. et al. 2009. **Vimentin inhibits ATF4-mediated osteocalcin transcription and osteoblast differentiation.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 44, p. 30518-30525.

LIN, J. et al. 2017. **The prognostic values of the expression of Vimentin, TP53, and Podoplanin in patients with cervical cancer.** *Cancer Cell International*, v. 17, n. 1, p. 80.

LIU, L. et al. 2010. **Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome.** *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, v. 23, n. 2, p. 213-224.

- MAO, X. et al. 2013. **Differential expression of fascin, E-cadherin and vimentin: Proteins associated with survival of cholangiocarcinoma patients.** *The American Journal of the Medical Sciences*, v. 346, n. 4, p. 261-268.
- MASCARELLO, K.; ZANDONADE, E.; AMORIM, M. 2013. **Survival analysis of women with cervical cancer treated at a referral hospital for oncology in Espírito Santo State, Brazil, 2000-2005.** *Cadernos de Saúde Pública*, v. 29, p. 823-831.
- MCCLOSKEY, R. et al. 2010. **Human Papillomavirus type 16 E6/E7 upregulation of nucleophosmin is important for proliferation and inhibition of differentiation.** *Journal of Virology*, v. 84, n. 10, p. 5131-5139.
- MIKESKA, T.; BOCK, C. 2012. **DNA methylation biomarkers in cancer: progress towards clinical implementation.** *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v. 12, n. 5, p. 473-487, 2012.
- MILESHKIN, L. et al. 2014. **Smokers with cervix cancer have more uterine corpus invasive disease and an increased risk of recurrence after treatment with chemoradiation.** *International Journal of Gynecological Cancer*, v. 24, n. 7, p. 1286-1291.
- MONSONEGO, J. et al. 2011. **Evaluation of oncogenic human papillomavirus RNA and DNA tests with liquid-based cytology in primary cervical cancer screening: the FASE study.** *International Journal of Cancer*, v. 129, n. 3, p. 691-701.
- MOODY, C.; LAIMINS, L. 2010. **Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation.** *Nature Reviews Cancer*, v. 10, n. 8, p. 550-560.
- MUÑOZ, N. et al. 2006. **HPV in the etiology of human cancer.** *Vaccine*, v. 24, n. SUPPL. 3, p. 1-10.
- MUSA, J. et al. 2017. **Effect of cervical cancer education and provider recommendation for screening on screening rates: a systematic review and meta-analysis.** *PloS one*, v. 12, n. 9, p. e0183924.
- MYONG, N. 2012. **Loss of E-cadherin and acquisition of vimentin in epithelial-mesenchymal transition are noble indicators of uterine cervix cancer progression.** *Korean Journal of Pathology*, v. 46, n. 4, p. 341-348.
- NAKAGAWA, J. et al. 2011. **Carcinoma do colo do útero: taxa de sobrevivência e fatores prognósticos em mulheres no Estado de Mato Grosso.** *ACTA Paulista de Enfermagem*, v. 24, n. 5, p. 631-637.
- NIETO, M. et al. 2016. **Emt: 2016.** *Cell*, v. 166, n. 1, p. 21-45.
- OGINO, S. et al. 2013. **Molecular psychological epidemiology of epigenetics: emerging integrative science to analyse environment, host, and disease.** *Modern Pathology - Nature*, v. 26, n. 4, p. 465-484.

- PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. 2016. **Targeting the epithelial-to-mesenchymal transition: the case for differentiation-based therapy.** *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, v. 81, p. 11-19.
- PERALTA, O. et al. 2013. **HPV-based screening, triage, treatment, and followup strategies in the management of cervical intraepithelial neoplasia.** *Obstetrics and gynecology International*, v. 2013, p. 15.
- PÉREZ-SALA, D. et al. 2015. **Vimentin filament organization and stress sensing depend on its single cysteine residue and zinc binding.** *Nature communications*, v. 6, p. 7287.
- PETRY, K.; WÖRMANN, B.; SCHNEIDER, A. 2014. **Benefits and risks of cervical cancer screening.** *Oncology Research and Treatment*, v. 37, n. suppl 3, p. 48-57.
- PHUA, D.; HUMBERT, P.; HUNZIKER, W. 2009. **Vimentin regulates scribble activity by protecting it from proteasomal degradation.** *Molecular Biology of The Cell*, v. 20, n. 12, p. 2841–2855.
- QUINN, J. et al. 2006. **Prospective validation of the San Francisco syncope rule to predict patients with serious outcomes.** *Annals of Emergency Medicine*, v. 47, n. 5, p. 448-454.
- RASPAGLIESI, F. et al. 2005. **Prognostic factors in microinvasive cervical squamous cell cancer: long-term results.** *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*, v. 15, n. 1, p. 88-93.
- RIDGE, K. et al. 2016. **Methods for determining the cellular functions of Vimentin intermediate filaments.** *Methods in Enzymology*, v. 568, p. 389-426.
- RODEN, R.; WU, T. 2006. **How will HPV vaccines affect cervical cancer?** *Nature Reviews Cancer*, v. 6, n. 10, p. 753-763.
- ROURA, E. et al. 2014. **Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: results from the EPIC cohort.** *International Journal of Cancer*, v. 135, n. 2, p. 453-466.
- SAITO, R. et al. **Fundamentos de oncologia molecular.** 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2015.
- SALIM, R. et al. 2017. **Cervical squamous intraepithelial lesions grades 1 and 2: value of an alternative morphological classification and of p16 immunohistochemistry in the prediction of clinical outcome.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 53, n. 5, p. 313-319.
- SANGHVI-SHAH, R.; WEBER, G. 2017. **Intermediate filaments at the junction of mechanotransduction, migration, and development.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 5, p. 81.
- SANKARANARAYANAN, R. et al. 2005. **A cluster randomized controlled trial of visual, cytology and human papillomavirus screening for cancer of the cervix in rural India.** *International Journal of Cancer*, v. 116, n. 4, p. 617-623.

SATELLI, A.; LI, S. 2011. **Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy Or Vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy.** *Cell Mol Life Sci.*, v. 68, n. 18, p. 3033-3046.

SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N. 2014. **Human Papillomavirus (HPV) infection and the multi-stage carcinogenesis of Cervical Cancer.** *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v. 1854, n. 4, p. 1-14, 2014.

SEER - Surveillance epidemiology and end results. **Cancer statistics review, 2011-2015.** National Cancer Institute, 2018. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/cervix.html>. Acesso em Abril 2018.

SELLORS, J.; SANKARANARAYANAN, R. **Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginner's manual.** Lyon: Diamond Pocket Books, 2003.

SHAIN, A. et al. 2018. **Utility of p16 immunohistochemistry in evaluating negative cervical biopsies following high-risk pap test results.** *American Journal of Surgical Pathology*, v. 42, n. 1, p. 69-75.

SHIBUE, T.; WEINBERG, R. A. 2017. **EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications.** *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 14, n. 10, p. 611-629.

SITOLE, B. N.; MAVRI-DAMELIN, D. 2018. **Peroxidasin is regulated by the epithelial-mesenchymal transition master transcription factor Snai1.** *Gene*, v. 646, p. 195-202.

SMITH, R. A. et al. 2011. **Cancer screening in the United States, 2011: a review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening.** *CA: Cancer Journal for Clinicians*, v. 61, p. 8-30.

STEEG, P. S. 2016. **Targeting metastasis.** *Nature Reviews Cancer*, v. 16, p. 201-218.

STEVENS, C. et al. 2013. **The intermediate filament protein, vimentin, is a regulator of NOD2 activity.** *Gut*, v. 62, n. 5, p. 695-707.

THIERY, J. et al. 2009. **Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.** *Cell*, v. 139, n. 5, p. 871-890.

TZIVION, G.; LUO, Z.; AVRUCH, J. 2000. **Calyculin A-induced vimentin phosphorylation sequesters 14-3-3 and displaces other 14-3-3 partners in vivo.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 38, p. 29772-29778.

VACCARELLA, S. et al. 2017. **Cervical cancer in Africa, Latin America and the Caribbean and Asia: regional inequalities and changing trends.** *International Journal of Cancer*, v. 141, n. 10, p. 1997-2001.

VUORILUOTO, K. et al. 2011. **Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer.** *Oncogene*, v. 30, n. 12, p. 1436-1448.

WANG, S.; HUANG, S.; SUN, Y. 2017. **Epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer: a review.** *BioMed Research International*, v. 2017.

WHEELER, C. M. 2013. **The natural history of cervical human papillomavirus infections and cervical cancer: gaps in knowledge and future horizons.** *Obstetrics and Gynecology Clinics*, v. 40, n. 2, p. 165-176.

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

YAMASHITA, T. et al. 2013. **Vimentin as a poor prognostic factor for triple-negative breast cancer.** *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 139, n. 5, p. 739-746.

YE, X.; WEINBERG, R. A. 2018. **Epithelial-Mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression.** *Trends in Cell Biology*, v. 25, n. 11, p. 675-686.

YU, J. Q. et al. 2015. **Expression of vimentin and Ki-67 proteins in cervical squamous cell carcinoma and their relationships with clinicopathological features.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 16, n. 10, p. 4271-4275.

YUAN, C.-H.; FILIPPOVA, M.; DUERKSEN-HUGHES, P. 2012. **Modulation of apoptotic pathways by Human Papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy.** *Viruses*, v. 4, n. 12, p. 3831-3850.

ZHANG, X. et al. 2017. **Distinct contributions of the thin and thick filaments to length-dependent activation in heart muscle.** *eLife*, v. 6.

ZHAO, J. et al. 2014. **Prognostic significance of the epithelial-to-mesenchymal transition markers e-cadherin, vimentin and twist in bladder cancer.** *International Brazilian Journal of Urology*, v. 40, n. 2, p. 179-189.

ZHU, Q.-S. et al. 2011. **Vimentin is a novel AKT1 target mediating motility and invasion.** *Oncogene*, v. 30, n. 4, p. 457-470.



Procedimento Operacional Padrão

IMUNOHISTOQUÍMICA DE TECIDO PARAFINADO

Número do procedimento: 1.0

Versão: 01

Data da emissão: 09/11/2015

Data	Revisões

PROCEDIMENTO:

1.1 – Preparação dos cortes histológicos

DESPARAFINIZAÇÃO

Xilol (a temperatura ambiente) 3x -----(5 a 10 min)

1.2 – Reidratação

1. ETOH 100% 3x----- (2 min)
2. ETOH 80%----- (2 min)
3. ETOH 50%----- (2 min)
4. Lavar em água corrente

1.3 – Bloqueio da peroxidase endógena

Procede-se ao bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em metanol (ou solução comercial a 3% = 10 volumes), em um banho de 5 minutos ou mais; seguem-se lavagens em água corrente e colocar na solução que já deve estar aquecendo na panela de pressão.

H₂O₂ (10 volumes) 3% -----(5 min)

1.4 – Recuperação antigênica

Enzima (proteínase K) -----(10 a 15 min)

Ácido cítrico (10mM) (4,2g)

Água destilada 2l

NaOH (2N) corrigir o pH (6,0)

INCUBAÇÃO EM CALOR ÚMIDO – as lâminas são incubadas em tampão citrato 10mM/pH 6,0 em panela de pressão, durante 7 minutos. Após resfriamento por 20 minutos, seguem-se lavagens em água corrente.

Panela de pressão ----- (7 min)

Resfriar -----(20 min)

1.5 – Diluição do anticorpo primário

Albumina 0,5% diluída em PBS

Titulação

1.6 – Reação utilizando o complexo de polímeros sintéticos

Lavar em água corrente

Colocar em bandeja com fundo de água

Molhar lâminas com PBS

Secar lâminas

Pingar bloqueador de proteína -----(5 a 10 min)

Pingar anticorpo primário (200 μ L)

Tampar bandejas e colocar na geladeira -----(overnight)

Lavar em água corrente e escorrer

Molhar com tampão PBS

Secar lâminas

Pingar pós-primário (tampar bandeja) -----(30 min)

Lavar em água corrente e escorrer

Molhar com tampão PBS

Secar lâminas

Pingar Polímero (tampar bandeja) -----(30 min)

Lavar em água corrente e escorrer

Molhar com tampão PBS

1.7 – Revelação

Preparar O DAB (diaminobenzidina é um possível agente carcinogênico, ao manipulá-lo usar luvas)

Pingar o DAB pronto em cada lâmina (100 μ l) -----(5 a 10 min)

Lavar em água corrente e escorrer

Colocar em cesta e lavar bem

Colocar em cuba de Hematoxilina para contracorar

Lavar em água corrente (até limpar o contracorante)

Imergir 3 a 4 vezes (rapidamente) a cesta na água amoniacal

Lavar em água corrente

1.8 – Desidratação

ETOH 100% 4x------(2 a 3 min)

Xilol 2x------(enquanto estiver montando)

1.9 - Montagem

Pingar 1 (uma) gota de Entellan em cada lamínula

Pingar 1 (uma) gota de xilol da lâmina a ser montada no Entellan e colar (virada para baixo)

Pressionar uma contra a outra e secar a lâmina

Se houver bolhas, retirar

Mergulhar no xilol e deixar secar apoiada na cuba

Colocar na bandeja de madeira

Confeccionar etiquetas e colar

- Importante: lavar bandejas com água e sabão (esfregar com bucha, para não ficar restos de DAB)

Observação 1: esse protocolo é baseado na utilização do kit de revelação da Leica, Novo Link.

2 RESULTADOS

As lâminas coradas serão avaliadas quanto à expressão dos marcadores empregados, utilizando microscópico óptico comum, por um patologista.

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE
AO CÂNCER EM GOIÁS -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES E DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DO HPV EM TUMORES ASSOCIADOS AO VÍRUS

Pesquisador: VERA APARECIDA SADDI

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 13580613.5.0000.0031

Instituição Proponente: ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE GOIÁS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 272.288

Data da Relatoria: 04/04/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de pesquisa acadêmica, fomentada pela FAPEG, visando analisar (retrospectivamente) dados de cerca de 500 prontuários de pacientes portadores de CEC de vulva, cabeça e pescoço e anus. Também visa análise de blocos de parafina para identificação de presença e tipo de HPV.

O estudo proposto é retrospectivo, analítico e visa determinar a prevalência do genoma do HPV e a distribuição genotípica do vírus em grupos de pacientes com carcinomas cervicais (200 casos), de vulva e vagina (100 casos), carcinomas anais (100 casos) e carcinomas de cavidade oral e orofaringe (100 casos). Os casos incluídos deverão ser aqueles diagnosticados no Hospital Araújo Jorge, a partir de 2005, que apresentem dados clínicos e histopatológicos satisfatórios, blocos de parafina disponíveis no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge e seguimento mínimo de cinco anos. A seleção será feita a partir de uma busca ativa nos livros de registros dos exames realizados no Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge, com os diagnósticos histopatológicos já especificados. O período de inclusão deve se iniciar a partir de 2005, até atingir o número de casos estabelecidos para cada um dos grupos. As lâminas coradas pela hematoxilina-eosina de cada exame anátomo- patológico serão revisadas e os casos selecionados de acordo com o diagnóstico histológico confirmado. Os blocos de parafina, correspondentes às lâminas revisadas, serão selecionados para as análises moleculares. A detecção e a genotipagem

Endereço: 239

Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITARIO

CEP: 74.605-070

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3243-7050

Fax: (62)3243-7050

E-mail: cepaccg@accg.org.br

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS -



Continuação do Parecer: 272.288

do HPV serão realizadas no Laboratório de Transplante de Medula Óssea/Laboratório de Radiobiologia e Oncogenética da Associação de Combate ao Câncer em Goiás e Laboratório de Genética e Biodiversidade da PUC-Goiás. Os tipos de HPV serão classificados em baixo e alto risco oncogênico com base no padrão filogenético, conforme a classificação proposta pela The International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). As análises imuno-histoquímicas serão realizadas no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Determinar a distribuição genotípica do HPV e as possíveis associações entre características clínico-patológicas, prognósticas e moleculares dos tumores associados ao vírus (carcinomas cervicais, de vulva, vagina, anus, cavidade oral e orofaringe).

Objetivo Secundário: - Identificar os tipos específicos de HPV detectados nos diferentes tumores associados ao vírus (carcinomas cervicais, de vulva, vagina, anus, cavidade oral e orofaringe). - Descrever os principais aspectos clínico-patológicos e prognósticos nos tumores associados ao HPV. - Avaliar a expressão imuno-histoquímica de Ki-67 e p16 nos tumores associados ao HPV. - Avaliar as possíveis associações entre os achados de detecção e genotipagem do HPV com os fatores clínico-epidemiológicos e moleculares dos tumores avaliados. - Avaliar o impacto dos diferentes genótipos do HPV no prognóstico dos pacientes com dos tumores associados ao vírus. - Produzir dados de prevalência e distribuição genotípica do HPV capazes de prever o impacto das vacinas na epidemiologia dos cânceres associados ao vírus.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem riscos relevantes.

Benefícios através do conhecimento de dados de prevalência de HPV entre portadores de CEC de vulva, anus, cabeça e pescoço, podendo implementar ou mudar o uso de vacinas contra HPV

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um importante projeto com potencial de elucidar lacunas científicas relevantes sobre o papel do HPV em CEC de anus, vulva e cabeça e pescoço.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados às exigências do CEP

Aparentemente, nada faltando

Pedem dispensa do TCLE (e estou de acordo)

Endereço: 239
Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITARIO CEP: 74.605-070
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3243-7050 Fax: (62)3243-7050 E-mail: cepaccg@accg.org.br

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE
AO CÂNCER EM GOIÁS -



Continuação do Parecer: 272.288

Recomendações:

Sem recomendacoes

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugiro aprovacao do projeto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer do relator acatado.

Estudo aprovado.

GOIANIA, 14 de Maio de 2013

Assinador por:
Adriano Augusto Peclat de Paula
(Coordenador)