

**ANÁLISE DOS PADRÕES DE EXPRESSÃO
IMUNOISTOQUÍMICA DA CICLOOXIGENASE-2
(COX-2), C-ERBB-2 E RECEPTOR DO FATOR DE
CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGFR) EM LESÕES
PRECURSORAS E INVASORAS DO COLO DO ÚTERO
ATRAVÉS DO TISSUE MICROARRAY**

ELZA MIEKO FUKAZAWA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de mestre**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

**Co-orientador: Dr. Francisco Ricardo Gualda
Coelho**

São Paulo

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Fukazawa, Elza Mieko

Análise dos padrões de expressão imunoistoquímica da ciclooxygenase-2 (COX-2), C-ERBB-2 E receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) em lesões precursoras e invasoras do colo do útero através do *tissue microarray* / Elza Mieko Fukazawa -- São Paulo, 2008.

53p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. CICLOOXIGENASE-2. 2. RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMICO. 3. PROTEINA C-ERBb-2. 4. INFECÇÕES POR PAPILOMAVIRUS. 5. IMUNOHISTOQUÍMICA. 6. CANCER DO COLO DO UTERO.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Eiko e Masaiuki Fukazawa

Que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade.

Aos meus irmãos, primos e tios

Você foi presença em solidão, respeitou profundamente minha maneira única de ser.

Sua companhia, seu sorriso, suas palavras e mesmo sua ausência foram expressão de amor profundo. Nos méritos desta conquista há muito de sua presença.

AGRADECIMENTOS

A secretaria da pós-graduação e toda equipe da biblioteca, em especial Ana, Luciana e Suely. Pessoas que durante a minha batalha demonstraram ser verdadeiras amigas. Obrigada pela força e apoio sem os quais não teria sido possível o término deste trabalho.

A equipe do SAME em especial a senhora Irde pela paciência e boa vontade durante o levantamento de prontuários.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares pela confiança depositada na idéia, pelo comprometimento em transformá-la em realidade e pela orientação.

Ao Dr. Ronaldo Lucio Rangel Costa dedico meu carinho e gratidão por ter sido verdadeiramente meu mestre e por me instigar com idéias e provocações que me levaram a este projeto.

Ao Prof. Dr. Wagner Gonçalves pela amizade, carinho e apoio dispensado.

À Inês Nishimoto pelo interesse e dedicação na orientação da análise estatística.

A todos os meus amigos que suportaram o mau humor e continuaram a me acompanhar durante a concepção deste trabalho, em especial: Soraia Senise, Thais Almeida, Nelson Vespa, Gabriel L. Pinto, Ademir Narciso, Maria Gabriela, Gisela Andreonni, Romualdo Quirino, Levon Badiglian

À Suely Fukasava o meu sincero agradecimento pela dedicação e auxílio no levantamento do banco de dados, digitação e revisão bibliográfica.

RESUMO

Fukazawa EM. **Análise dos padrões de expressão imunoistoquímica da ciclooxigenase-2 (COX-2), C-ERBB-2 E receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) em lesões precursoras e invasoras do colo do útero através do *tissue microarray***. São Paulo; 2008. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

O câncer do colo do útero permanece como importante problema de saúde em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento. A introdução de vários sistemas de culturas de células para analisar o mecanismo de múltiplas etapas da carcinogênese do colo do útero, propiciou melhor compreensão das vias de sinalização envolvidas no controle da proliferação celular da neoplasia intra-epitelial (NIC) para o carcinoma invasivo. Dessa forma a interação das proteínas E6 e E7 do HPV de alto risco com vias de sinalização da COX-2, EGFR e c-erbB-2 parece constituir importante via carcinogênica no colo do útero. Além disso, estudos recentes demonstram interação entre as vias de sinalização da COX-2 com o do EGFR e c-erbB-2, formando uma alça de amplificação dos sinais que facilitam o processo carcinogênico. No entanto nenhum estudo tem analisado a expressão destas três proteínas na transição das NICs de graus I, II e III para o carcinoma invasor em amostras de tecido. Com o intuito de analisar a expressão destas proteínas durante a progressão do carcinoma epidermóide do colo do útero, resgatou-se 179 amostras de carcinoma epidermóide estágio clínico I e 232 de NIC, do arquivo de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo e Instituto Brasileiro de Controle ao Câncer. Os resultados da imunoistoquímica foram analisados através do ACIS III(sistema de análise de imagem automatizado). O método digital permite análise quantitativa da expressão proteica de modo rápido e confiável, além de resolver a discordância entre os diversos observadores com relação à intensidade de imunomarcagem. A intensidade da expressão da COX-2, EGFR e c-erbB-2 correlacionaram-se com o grau de severidade histológica da NIC para o CEC com $p < 0,0001$. O presente estudo sugere que estas proteínas podem estar envolvidas na progressão do câncer do colo do útero e que a avaliação quantitativa destes marcadores por meio da análise digital demonstra ser ferramenta eficiente.

SUMMARY

Fukazawa EM. **[Analysis of COX-2, EGFR and c-erbB-2 expression in non-invasive squamous precursor lesions and cervical squamous cell carcinoma assessed using tissue microarray]**. São Paulo; 2008. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Cervical cancer is an important health problem all around the world, mainly in developing countries. The introduction of many cell culture systems which analyse the mechanism of multi-step cervical carcinogenesis permitted a better comprehension of the signal transduction pathways involved at the control for cell proliferation of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) to invasive carcinoma. Thus, the interaction of proteins E6 and E7 of high risk HPV type with COX-2, EGFR and c-erbB-2 cellular protein seems to build an important carcinogenic pathway at cervical cancer. In addition to that, recent works demonstrate cross-talk between COX-2 and ErbB family signaling pathways, involving extensive feedback regulation to amplify the signaling that facilitate the carcinogenic process. On the other hand, none study has related the expression of these proteins at transition of CIN with grades I, II and III to cervical squamous carcinoma in tissue samples. With intention of analyze the expression for these proteins during the progression of cervical squamous carcinoma, 179 cervical squamous carcinoma samples with clinic stage I and 232 CIN sample were recovered from the Pathologic Anatomy's File of AC Camargo Hospital and IBCB. We chose to interpret the results of immunohistochemical analysis using the Automated Cellular Imaging System (ACIS) for digital microscopy-assisted analysis. With the assistance of a computer, ACIS analysis help eliminate the inherent variability of pathologist based scoring. The intensity of expression of COX-2, EGFR and c-erbB-2 is correlated with the CIN histological severity for CEC with $p < 0,001$. The present study suggests that these proteins can be involved at the progression of cervical cancer and the use of automated image analysis to remove some of the subjective nature of assay interpretation may all increase the precision of immunohistochemical.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	O Genoma do HPV com suas principais funções e interação com o hospedeiro.....	5
Figura 2	O ciclo de vida do Papiloma Vírus e sua relação com desenvolvimento da NIC.....	7
Figura 3	O mecanismo de ação da COX - 2 na carcinogênese.....	11
Figura 4	Família de receptores ErbB.....	12
Figura 5	Elementos regulatórios na região promotora do COX-2.....	15
Figura 6	Ativação da via de sinalização da COX-2 pelo EGFR.....	16
Figura 7	Mecanismo de Transativação do EGFR.....	17
Figura 8	Ativação da COX -2 e EGFR pelo tabaco.....	18
Figura 9	EGFR, COX-2 e c-erbB-2 na carcinogênese HPV induzida.....	20
Figura 10	COX – 2 e progressão do carcinoma epidermóide do colo do útero...	28
Figura 11	Expressão da COX-2. A- Epitélio Normal; B- NIC I; C-NIC III; D- transição NIC/CEC micro invasor.....	29
Figura 12	Expressão da COX-2, A-CEC com fraca coloração; B- CEC com forte coloração; C-CEC; D-CEC em grande aumento.....	30
Figura 13	Frequência de distribuição das NICs e CEC nas diferentes escalas de intensidade de expressão da COX-2.....	31
Figura 14	EGFR e Progressão do CEC no Colo Uterino.....	32
Figura 15	Frequência de distribuição das NICs e CEC nas diferentes escalas de intensidade de expressão do EGFR.....	33
Figura 16	Expressão do EGFR durante progressão do câncer do colo do útero..	34
Figura 17	Exemplos do escore imunoistoquímico do c-erbB-2.....	35
Figura 18	Expressão de c-erbB-2 na NIC e no CEC.....	36
Figura 19	Porcentagem de expressão do c-erbB-2 nos diferentes graus de NIC e CEC.....	37
Figura 20	Expressão do c-erbB-2 nos diferentes graus de NIC e CEC.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

CEC	Carcinoma espinocelular
COX	Ciclooxygenase.
DNA	Ácido desoxirribonucléico.
E1, E2, E4, E5, E6, E7	Genes de leitura precoce (<i>Early</i>)
EGF	Fator de crescimento epidérmico (do inglês <i>epithelial growth (factor)</i>)
EGFR	Receptores de fatores de crescimento (do inglês <i>epithelial growth factor receptor</i>).
ErbB	Human epidermal growth factor receptor
FIGO	<i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i> .
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GPCR	Proteína G acoplada a receptores
HPV	Papiloma vírus Humano (do inglês, Human papillomavirus)
IBCC	Instituto Brasileiro de Controle ao Câncer
IL-1	Interleucina 1
INFγ	Interferon gama
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LCR	Região não codificadora (do inglês, <i>large control region</i>).
LH	Hormônio Luteinizante
L1 e L2	Genes de leitura tardia (<i>Late</i>)
LPS	Lipopolissacarídeos
n°	Total de casos
NEG	Número de casos negativos.
NIC	Neoplasia intra-epitelial.
NIC I	Neoplasia intra-epitelial de grau I
NIC II	Neoplasia intra-epitelial de grau II
NIC III	Neoplasia intra-epitelial de grau III
ORF	Janelas de leitura (do inglês, <i>open reading frames</i>)

OMS	Organização Mundial de Saúde
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas.
POS	Número de casos positivos.
%POS	Porcentagem de casos positivos
p	Significância estatística
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase
TMA	<i>Tissue microarray</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	COX-2	9
1.2	EGFR E HER – 2 (c – erbB -2)	12
1.3	Interação entre COX-2, EGFR e ErbB-2	15
2	OBJETIVOS	21
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	22
3.1	Seleção de amostras e Revisão	22
3.2	Construção do <i>Tissue Microarray</i>	23
3.3	Imunoistoquímica	24
3.4	Interpretação das reações imunoistoquímicas	25
3.5	Análise Estatística	26
4	RESULTADOS	27
4.1	Expressão da COX-2 na seqüência NICI, NICII, NICIII e carcinoma invasor	27
4.2	Expressão do EGFR na seqüência NIC I, NIC II, NIC III e carcinoma invasor	31
4.3	Expressão de c-erbB-2 na seqüência NIC I, NIC II, NIC III carcinoma invasor	35
5	DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÕES	43
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

ANEXOS

- Anexo 1** Aprovação do Comitê de Ética do Hospital A C. Camargo
- Anexo 2** Aprovação do Comitê de Ética do IBCC
- Anexo 3** Construção do *Tissue Microarrays*
- Anexo 4** ACIS III, especificações do produto
- Anexo 5** ACIS III, análise do *Tissue Microarray*

1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é a segunda neoplasia mais comum entre mulheres no mundo. Há registros de quinhentos mil casos novos ao ano e cerca de 230 mil mulheres vão a óbito devido a esta neoplasia (Ministério da Saúde 2007).

Em torno de 80% dos casos novos ocorrem nos países em desenvolvimento. Atribui-se este alto índice, principalmente, à falta de um programa de rastreamento adequado. Estima-se que no ano de 2008 o Brasil tenha cerca de 18.680 novos casos de câncer do colo do útero, com um risco estimado de 19 casos a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2007).

O tipo histológico mais freqüente de carcinoma invasivo do colo do útero é o carcinoma epidermóide, constituído por células malignas originadas no epitélio plano estratificado. O carcinoma epidermóide do colo do útero é sempre precedido por alterações cito arquiteturais, restritas ao epitélio de revestimento do colo do útero, sem invasão do estroma cervical, caracterizando as neoplasias intra-epiteliais do colo do útero (NIC). Essas lesões foram descritas no início do século XX e receberam a denominação de displasia (leve, moderada, severa) e carcinoma *in situ* pelo Comitê da *International Federation of Gynecology and Obstetric*, da Organização Mundial de Saúde em 1961 [FIGO/OMS] (WRIGHT et al. 2002).

Em 1967, Richard, introduziu o termo neoplasias intra-epiteliais do colo do útero (NIC). Dividiu-as em graus I, II, III, dependendo da proporção da espessura do epitélio que apresenta células maduras e indiferenciadas (WRIGHT et al. 2002). Na NIC I as células indiferenciadas estão limitadas ao terço inferior do epitélio. Na NIC

II estas alterações celulares estão restritas aos 2/3 inferiores do epitélio e nas lesões NIC III as anomalias nucleares se estendem por toda a espessura do epitélio.

Em 1988, na cidade de Bethesda, um grupo de especialistas criou o Sistema Bethesda para classificar as alterações citológicas observadas nessas lesões, que precedem o carcinoma invasivo. De acordo com esta classificação a displasia leve ou NIC I e casos de condilomas correspondem às lesões intra-epiteliais de baixo grau. As displasias moderadas, acentuadas ou NIC II e III e o carcinoma *in situ* correspondem às lesões intra-epiteliais de alto grau (WRIGHT et al. 2002). A correspondência entre as principais classificações citológicas e histopatológicas estão sumarizadas na tabela 1. A terminologia de NIC foi adotada neste estudo para nos referirmos a essas lesões.

Tabela 1 - Correspondência entre as principais classificações cito- histopatológicas.

FIGO/OMS (1961)	Richard (1967)	Sistema de Bethesda (1988-2001)
Displasia leve	NIC I	Lesão intra-epitelial de baixo grau
Displasia moderada	NIC II	Lesão intra-epitelial de alto grau
Displasia acentuada	NIC III	Lesão intra-epitelial de alto grau
Carcinoma <i>in situ</i>	NIC III	Lesão intra-epitelial de alto grau

Legenda: FIGO = *International Federation of Gynecology and Obstetrics*; OMS = Organização Mundial de Saúde; NIC - neoplasia intra-epitelial.

Fonte: WRIGHT et al. (2002)

Em exaustiva revisão na literatura sobre a história natural da NIC durante os últimos 40 anos, OSTOR (1993) relata que a frequência média de progressão para carcinoma *in situ* é de 11% para a NIC I e de 22% para a NIC II. A probabilidade de

a NIC progredir para carcinoma invasor é de 1% para NIC I, para NIC II é de 5 % e para a NIC III ultrapassa 12% (PALO et al. 2002).

A integração dos dados oriundos dos laboratórios de pesquisa básica com aqueles extraídos dos estudos epidemiológicos e clínicos tem imputado ao vírus Papiloma Humano (do inglês, Human papillomavirus - HPV) o papel principal na carcinogênese das neoplasias epiteliais primárias do trato genital inferior.

Mais de 100 tipos de HPV já foram identificados, sendo que 40 deles podem infectar o trato genital. Estes tipos de HPV são classificados como de baixo e alto risco baseado na taxa de prevalência de câncer cervical e seus precursores. Tipos de baixo risco, como o 6 e 11, causam lesões benignas com mínimo risco de progressão para o câncer. Em contraste HPVs de alto risco possuem alto potencial oncogênico. Aproximadamente 99% dos cânceres de colo do útero contêm ácido desoxirribonucléico (DNA) do HPV do tipo alto risco, com o tipo 16 sendo o mais prevalente, seguido pelos tipos 18, 31, 33 e 45 (SOUTHERN e HERRINGTON 1998; LONGWORTH e LAIMONIS 2004; VILLA 2006; BOCCARDO e VILLA 2007; BOULET et al. 2007; WOODMAN et al. 2007).

O genoma do Papiloma vírus Humano constitui-se num DNA circular de dupla fita com aproximadamente oito mil pares de bases. Este contém oito janelas de leitura (*open reading frames* - ORF) onde posicionam genes de leitura precoce (*Early*) E1, E2, E4, E5, E6, E7; de leitura tardia (*Late*) L1 e L2. Há também uma região não codificadora (*large control region*-LCR) que controla os demais genes (DOORBAR 2006; VILLA 2006; BOCCARDO e VILLA 2007; BOULET et al. 2007).

Cada um dos genes atua por meio da proteína de mesmo nome, que apresenta função específica, a saber:

E1- responde pela replicação episomal do vírus.

E2- regula negativamente as funções das proteínas E6 e E7.

E4- codifica várias proteínas que rompem a rede de queratina citoplasmática.

E5- induz a proliferação celular por sua interação com o EGFR.

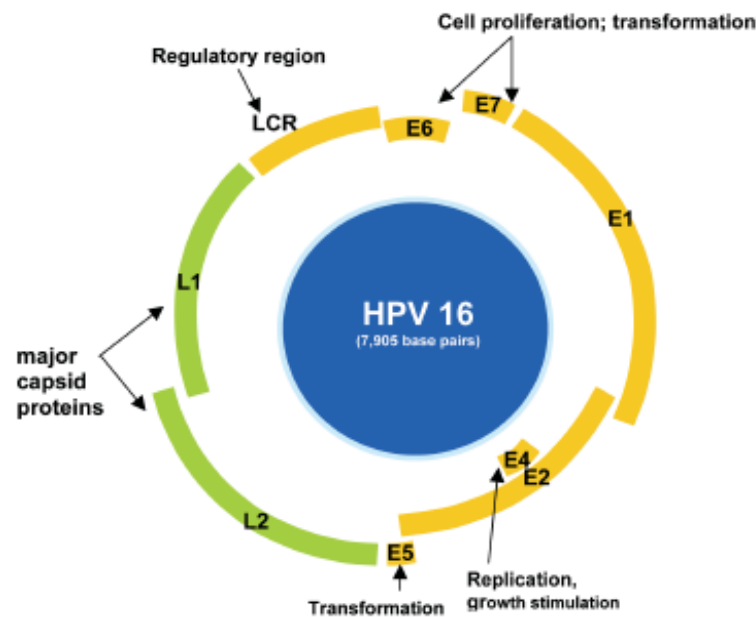
E6- provoca destruição da proteína p53 da célula hospedeira via ubiquitina e mantém o comprimento da telomerase acima de seu ponto crítico, impedindo a apoptose.

E7- inativa a proteína pRB da célula hospedeira, impedindo o bloqueio do ciclo celular.

L1- sintetiza a proteína principal do capsídeo viral.

L2- expressa a proteína secundária do capsídeo viral.

Estes aspectos estão sumarizados na Figura 1



Legenda: LCR - região não codificadora (do inglês, *large control region*); L1 e L2 – genes de leitura tardia (*Late*); E1, E2, E4, E5, E6, E7 - genes de leitura precoce (*Early*); HPV - Papiloma vírus Humano (do inglês, *Human papillomavirus*).

Fonte: VILLA (2006)

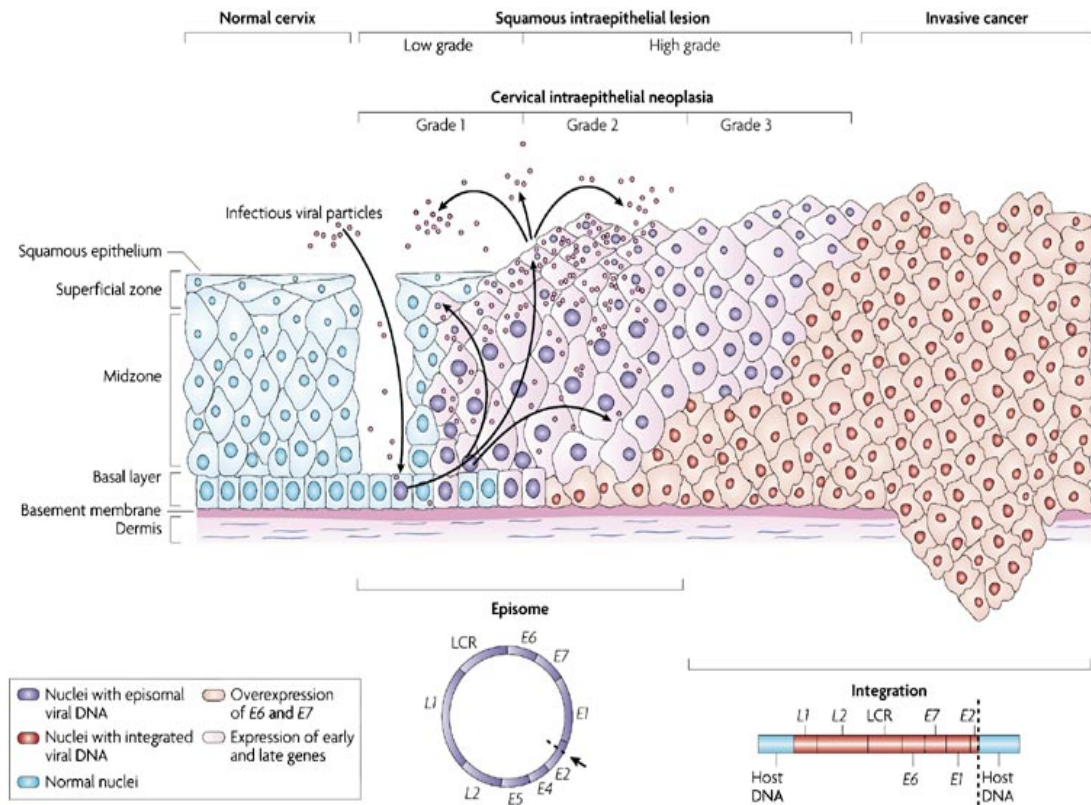
Figura 1 - O genoma do HPV com suas principais funções e interação com o hospedeiro.

A infecção persistente com HPVs de alto risco é o principal fator para o desenvolvimento do câncer cervical (STANLEY 2001; DOORBAR 2005; SNIJDERS et al. 2006; BOCCARDO e VILLA 2007).

Durante a progressão tumoral da NIC I para NIC III a regulação normal do ciclo de vida do HPV é perdida. Enquanto lesões de baixo grau (NIC I) representam infecções produtivas pelo HPV, com o genoma viral sendo mantido na forma episomal, as lesões NIC II e III representam infecções abortivas na qual a expressão gênica viral torna-se desregulada. As bases moleculares para estas mudanças não estão completamente elucidadas, mas algumas refletem mudanças nos níveis de expressão da E6 e E7 que ocorrem após integração do genoma viral dentro do cromossomo hospedeiro (DOORBAR 2006; BOULET et al. 2007).

A integração do genoma do HPV dentro do cromossomo da célula hospedeira é considerada evento crítico no desenvolvimento do câncer de colo do útero e, embora isto possa ocorrer randomicamente por todo o genoma, vários estudos indicam a preferência para integração em sítios frágeis comuns. Aparentemente, mudanças na expressão dos genes próximos aos sítios de integração poderiam participar do processo carcinogênico (DOORBAR 2006).

Ao considerar o genoma viral, a integração resulta freqüentemente na perda da região E2, levando à produção desregulada das proteínas E6 e E7. A síntese contínua destas proteínas é uma etapa essencial e necessária para o desenvolvimento da neoplasia maligna (DOORBAR 2006; VILLA 2006; BOCCARDO e VILLA 2007; WOODMAN et al. 2007). Estas interações estão sumarizadas na Figura 2.



Fonte: WOODMAN et al (2007).

Figura 2 - O ciclo de vida do Papiloma vírus e sua relação com desenvolvimento da NIC.

As proteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco são capazes de desregular os mecanismos de controle do ciclo celular e apoptose, ao interagir com a proteína supressora de tumor p53 e proteína do retinoblastoma (pRB). Esta interação provoca a degradação e inativação dessas proteínas, alterando a capacidade das células de controlar os mecanismos de reparo de DNA que ocorrem ao final da fase S do ciclo celular, favorecendo assim o acúmulo de mutações (SOUTHERN e HERRINGTON 1998; STANLEY 2001; DOORBAR 2006; VILLA 2006; SNIJDERS et al. 2006).

Apesar da exposição frequente das mulheres ao HPV, o surgimento da neoplasia cervical é pouco comum. A maioria das anomalias cervicais causadas pela

infecção do HPV tem pouca probabilidade de progredir a NIC II/ III e CEC. A maioria regride espontaneamente (SOUTHERN e HERRINGTON 1998; STANLEY 2001).

A longa duração entre a infecção inicial e a doença manifesta indica que vários co-fatores (tabagismo, efeitos hormonais, resposta imune, hábitos sexuais) devem ser necessários para a progressão da doença. A combinação de cada fator resulta em uma rede de eventos moleculares envolvidos na progressão da neoplasia intra-epitelial para neoplasia invasora (SNIJDERS et al. 2006; DOORBAR 2006; WOODMAN et al. 2007).

Os modelos de carcinogênese *in vitro* têm sido de grande valia para identificação das etapas adicionais necessárias no processo de evolução das lesões intra-epiteliais para o carcinoma invasor (SNIJDERS et al. 2006).

Partindo-se do princípio de que a célula alvo do HPV é o ceratinócito humano, experimentos em cultura de células demonstraram que no ceratinócito normal submetido a estresse hiperosmótico, o metabolismo do ácido araquidônico é ativado pelo EGFR (do inglês *epithelial growth factor receptor*) (RODRÍGUEZ et al. 2002).

Linhagens de células do câncer do colo do útero expressando as proteínas E6 e E7 do HPV de alto risco apresentam maior síntese da proteína COX-2 e prostaglandinas E2, quando comparados com linhagem de células não infectadas (SUBBARAMAIAH e DANNENBERG 2007).

A literatura relata que modelos de carcinogênese *in vitro* mediado pelo HPV 16 demonstram aumento nos níveis do EGFR nos diferentes estágios de transformação HPV induzido e que altos níveis do EGFR são importantes na

imortalização e conversão para o fenótipo maligno (HU et al. 1997; WOODWORTH et al. 2000; AKERMAN et al. 2001).

O HPV modula o crescimento celular ao interagir com proteínas associadas à membrana celular. Esta função é exercida pela proteína E5 que tem como principal alvo o EGFR. A proteína E5 promove a dimerização do receptor e retarda a remoção e degradação do EGFR, resultando na sinalização prolongada do EGFR e aumento do potencial proliferativo da célula (CHANG et al. 2001; McCANCE 2005; BOCCARDO e VILLA 2007).

A proteína E6 do HPV 16 é capaz de aumentar a expressão do c-erbB-2 durante a transformação neoplásica do ceratinócito cervical humano (NARISAWA-SAITO et al. 2007). Demonstrou-se que a superexpressão das proteínas E6/ E7 do HPV 16 e c-erbB-2 induz a transformação neoplásica das células normais do epitélio oral. (MOUSTAFA et al. 2004).

Estes trabalhos demonstram que o modelo de carcinogênese *in vitro* induzida pelo HPV de alto risco, pode envolver as vias de sinalização do EGFR, c-erbB-2 e COX-2.

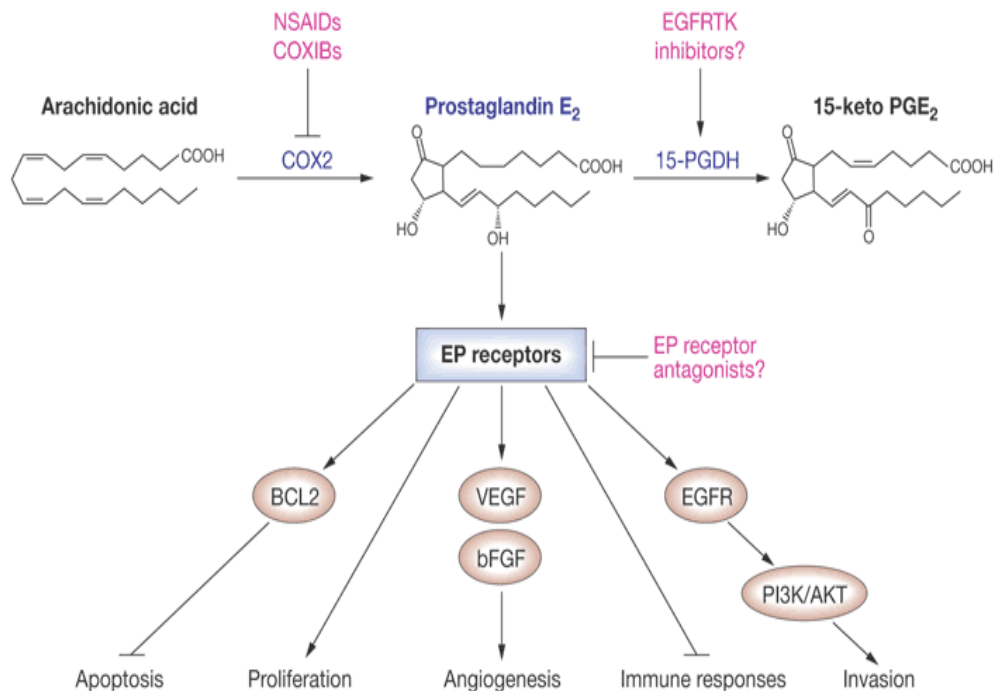
1.1 COX – 2

A ciclooxigenase (COX) é a enzima requerida para conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas. Duas isoformas foram identificadas, a COX-1 e a COX-2. A enzima COX-1 é expressa constitutivamente em grande parte dos tecidos e parece ser responsável pela produção de prostaglandinas, que controlam funções fisiológicas normais, incluindo a manutenção da mucosa gástrica, regulação do

fluxo sanguíneo renal e agregação plaquetária. A COX-2 é indetectável na maioria dos tecidos e várias pesquisas sobre sua expressão demonstram que a COX-2 está relacionada ao desenvolvimento e progressão tumoral (FOSSLIEN 2000; TURINI e DUBOIS 2002; SUBBARAMAIAH e DANNENBERG 2003; CHUN e SURH 2004).

A expressão da COX-2 é induzida por diversos fatores pró-inflamatórios (IL-1, TNF α , INF γ , LPS), hormônios (FSH/LH e estrógeno), fatores de crescimento (EGF, PDGF e FGF) e oncogenes (v-Src e v-Ras, Wnt, HER-2) (TANABE e TOHNAI 2002, TURINI e DUBOIS 2002).

A superexpressão da enzima COX-2 acarreta o aumento da quantidade de prostaglandinas nos tumores, sendo a prostaglandina E₂ a mais abundante prostaglandina detectada nas neoplasias epiteliais malignas. Os mecanismos implicados na carcinogênese ligada à COX-2 estão relacionados à capacidade da prostaglandina E em estimular a proliferação celular, a angiogênese, o maior poder de invasão, a inibição da apoptose e a diminuição da resposta imunológica (DANNENBERG et al. 2005). Estes mecanismos de ação estão resumidos na Figura 3.



Fonte: MANN et al. (2005)

Figura 3 - O mecanismo de ação da COX - 2 na carcinogênese.

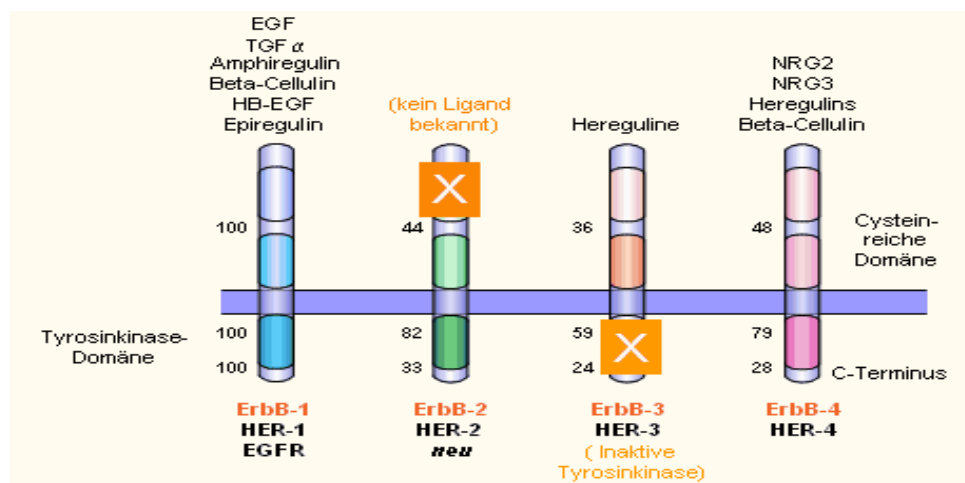
Diversos estudos epidemiológicos e experimentos *in vitro* evidenciam a participação da COX-2 no desenvolvimento de processos neoplásicos, abrindo perspectiva para o uso de inibidores específicos da COX-2 na prevenção e no tratamento de diversos tipos de câncer. Por meio da imunoistoquímica demonstrou-se a expressão da COX-2 nas lesões pré-malignas como leucoplasia oral, queratose actínica, neoplasia intra-epitelial prostática, carcinoma *in situ* de bexiga e mama assim como em neoplasias intra-epiteliais do colo do útero (DANNENBERG et al. 2005).

No câncer do colo do útero a expressão da COX-2 está relacionada com os diversos graus da NIC e carcinoma invasor, sugerindo que a COX-2 pode participar da carcinogênese do colo do útero e do processo de invasão (FARLEY et al. 2004;

KIM et al. 2005; DURSUN et al. 2007). A elevada expressão da COX-2 relaciona-se com pior fator prognóstico nas pacientes com doença localmente avançada. Estes achados, no entanto, não são demonstrados nos estádios iniciais do câncer do colo do útero tratados através da cirurgia radical (MANCHANA et al. 2006).

1.2 EGFR e HER-2(c-erbB-2)

A família de proteínas ErbB são receptores de membrana tipo I, cuja função é ativar a via de sinalização intracelular em resposta ao sinal extracelular e é formada por quatro receptores: EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3, ErbB4/HER4 (YARDEN e SLIWKOWSKI 2001; HYNES e LANE 2005, GRANDIS e SOK 2004; NAIR 2005). A estrutura de cada um deles está representada na Figura 4.



Fonte: DICKER (2006)

Figura 4 - Família de receptores ErbB.

Todos os membros da família possuem um domínio extracelular, onde se encontra o sítio de ligação para a molécula sinalizadora, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático com atividade tirosinoquinase, exceto para o HER3 onde este não é funcionante (YARDEN e SLIWKOWSKI 2001; GRANDIS e SOK 2004; HYNES e LANE 2005; NAIR 2005). O domínio extracelular das proteínas ErbB pode apresentar-se sob a conformação inibida ou conformação ativa (Anonymus 2007; MOASSER 2007).

São conhecidas pelo menos 30 moléculas sinalizadoras, que geralmente são pequenas proteínas secretadas pela célula no espaço intercelular, denominados como fatores de crescimento. Todos os fatores de crescimento são sintetizados a princípio como precursores ancorados à membrana e de forma subsequente são liberados da célula por proteólise (HYNES e LANE 2005; NAIR 2005; Anonymus 2007).

A interação entre o receptor e o seu fator de crescimento, inicia mudança na conformação do seu domínio extracelular de inativo para ativo e promove sua dimerização. Cada receptor homodimérico ou heterodimérico inicia uma complexa cascata de sinalização, que resulta na proliferação celular, diferenciação, migração, adesão e transformação. A seleção de parceiros para dimerização determina a atividade sinalizadora entre as proteínas ErbB (YARDEN e SLIWKOWSKI 2001; HYNES e LANE 2005; NAIR 2005; MOASSER 2007).

O c-erbB-2 é o único receptor que possui uma conformação fixa na forma ativa, mesmo na ausência de um ligante, sendo o parceiro preferido para dimerização do EGFR, HER-3 e HER-4. A dimerização com c-erbB-2 aumenta a capacidade transformante dos outros receptores da família ErbB (YARDEN e SLIWKOWSKI 2001; Anonymus 2007; MOASSER 2007).

Nas células tumorais, a família de receptores ErbB é ativada por vários mecanismos, incluindo a mutação, a superexpressão e produção autócrina e parácrina dos fatores de crescimento. Na estimulação parácrina dos receptores ErbB, os fatores de crescimento são liberados pelas células do estroma, enquanto a estimulação autócrina resulta da liberação dos fatores de crescimento ancorados na membrana celular (HYNES e LANE 2005).

O aumento da expressão protéica do c-erbB-2, seja pela amplificação gênica ou por meio da desregulação transcricional, ocorre em aproximadamente 25 a 30% dos casos de câncer de mama e ovário e confere pior comportamento biológico. A amplificação do gene c-erbB-2 parece ser um evento precoce durante a carcinogênese mamária, sendo demonstrado em quase 50% de todos os carcinomas *ductais in situ* da mama. O c-erbB-2 é mantido durante a progressão para doença invasiva e metástase a distância. A superexpressão e amplificação do c-erbB-2 também ocorrem no câncer gástrico, esofágico e endometrial (MOASSER 2007).

A taxa de detecção do c-erbB-2 varia de 20 a 100% no câncer do colo do útero e amplificação do gene foi detectada em 0 a 36% dos casos (NARISAWA-SAITO et al. 2007). O significado do c-erbB-2 na carcinogênese do colo do útero não está completamente esclarecido, parece que a função do c-erbB-2 está implicado na transformação maligna do ceratinócito HPV induzida (MOUSTAFA et al. 2004; YASMEEN et al. 2007; NARISAWA-SAITO et al. 2007).

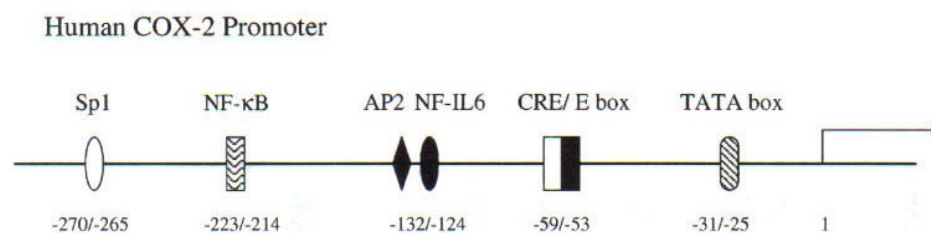
A superexpressão do EGFR é detectada nas lesões pré malignas do epitélio oral, do pulmão, da próstata e do colo do útero (GRANDIS e SOK 2004). No câncer do colo do útero o EGFR está superexpresso em 6-85% dos casos entre diferentes estudos (OH et al. 2000; KIM et al. 2002), assim como em 38 a 46% dos diferentes

graus de NIC, sugerindo que o EGFR pode ter função importante em estágios precoces da carcinogênese do colo do útero (NGAN et al. 2001).

MATHUR et al. (2001) demonstraram por imunofluorescência correlação entre a expressão das proteínas E6 e E7 do HPV 16 e a expressão do EGFR em mulheres com NIC III e câncer cervical.

1.3 INTERAÇÃO ENTRE COX-2, EGFR E c-ErbB-2

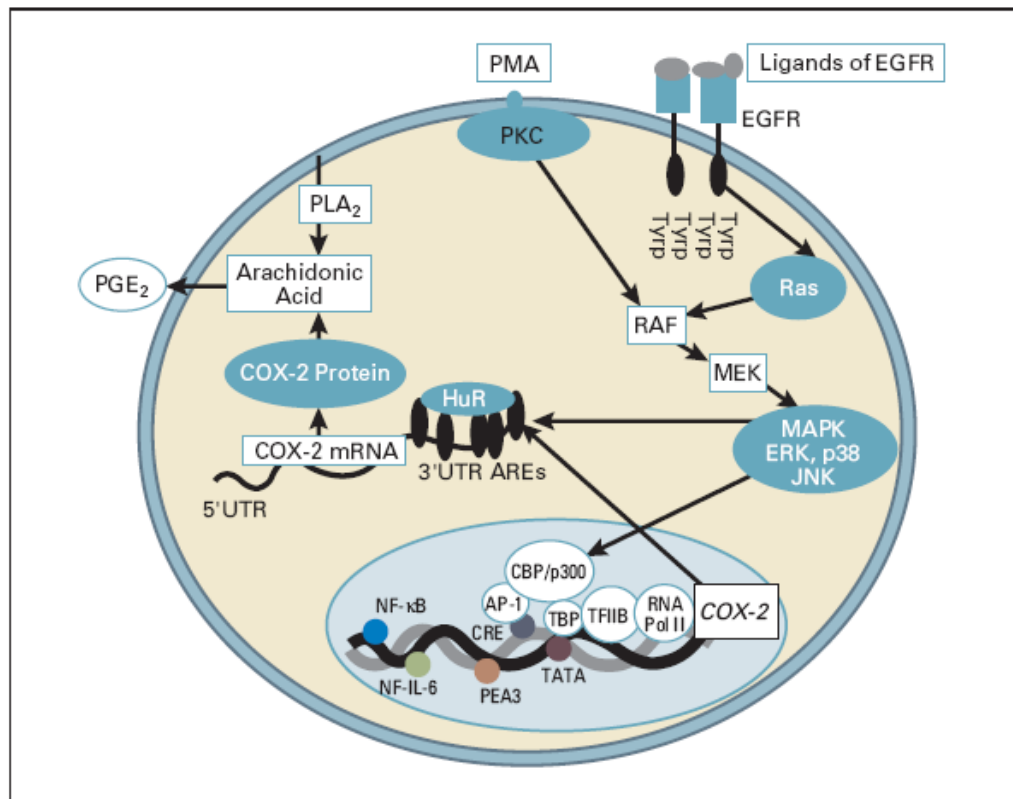
De particular relevância e complexidade é a interação entre COX-2 e membros da família ErbB de receptores. Diversos estudos descreveram as vias de sinalização que estimulam a transcrição do gene COX-2 nos diversos tecidos e células, verificando-se que existem vários elementos regulatórios na região promotora do gene COX-2, como demonstrado na Figura 5 (TANABE e TOHNAI 2002).



Fonte: TANABE e TOHNAI (2002)

Figura 5 - Elementos regulatórios na região promotora do COX-2

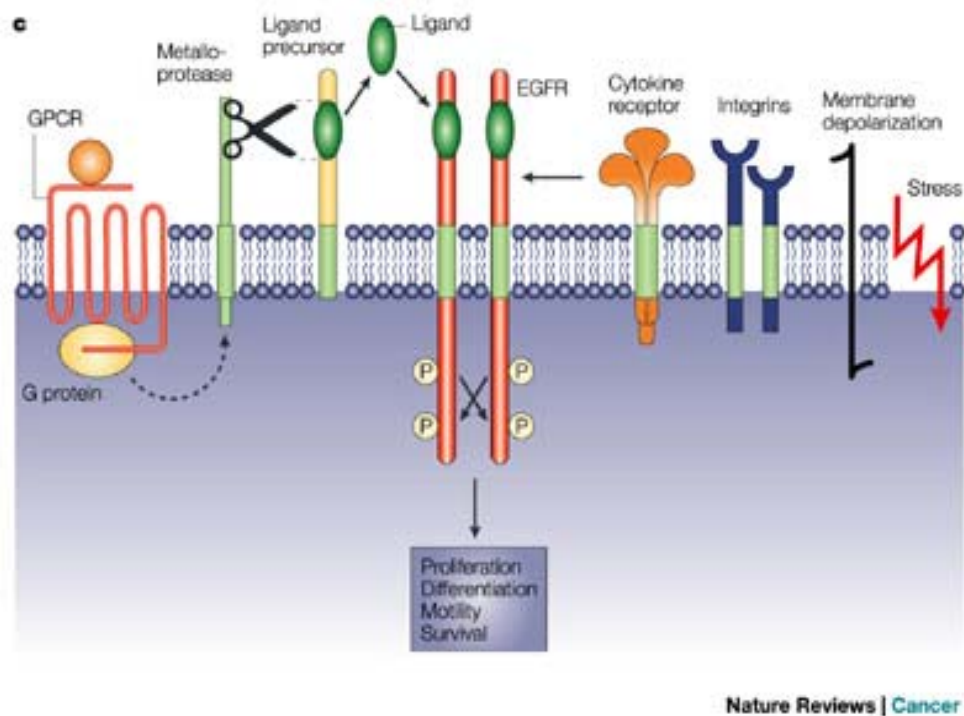
Desta forma, qualquer fator que ative estes elementos regulatórios pode estimular a expressão da COX-2. Dentre estes fatores encontra-se o EGFR, e maiores detalhes desta interação podem ser observados na Figura 6.



Fonte: DANNENBERG et al. (2005).

Figura 6 - Ativação da via de sinalização da COX-2 pelo EGFR

A PGE₂ derivada da COX-2 pode ativar a sinalização do EGFR por meio da estimulação autócrina do EGFR, mediado pela GPCR (Proteína G acoplada ao receptor). Por um mecanismo ainda desconhecido as GPCRs podem ativar proteases envolvidas na liberação dos fatores de crescimento ancorados na membrana plasmática. Ligantes solúveis liberados por este mecanismo ativam o EGFR (GSCHWIND et al. 2004; DANNENBERG et al. 2005; HYNES e LANE 2005; DORSAN e GUTKIND 2007). Este mecanismo de ativação do EGFR é ilustrado na Figura 7.



Fonte: GSCHWIND et al. (2004)

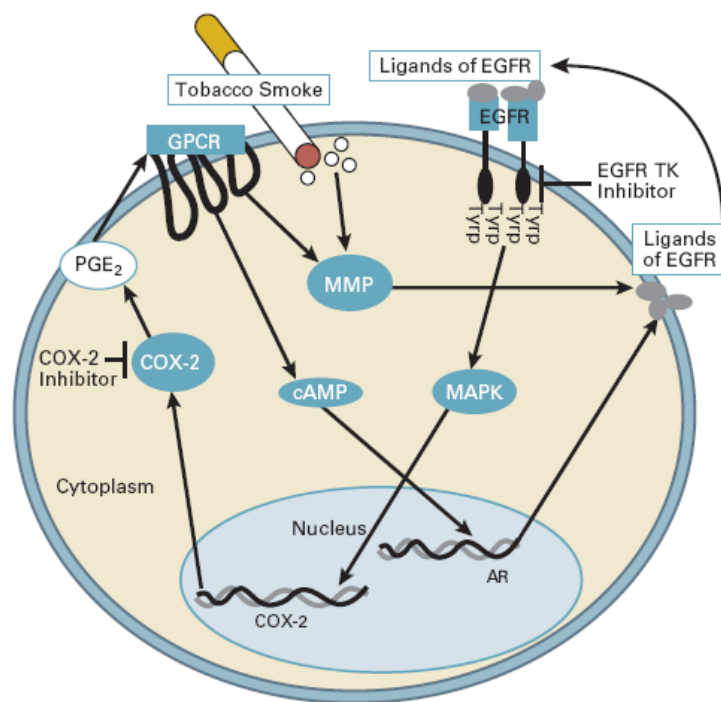
Figura 7 - Mecanismo de Transativação do EGFR

Sendo assim, o aumento dos níveis de prostaglandinas E2 derivada da COX-2 pode iniciar uma alça de retroalimentação positiva, ativando o EGFR. O EGFR ativado pela prostaglandinas E2, por sua vez, pode estimular a expressão da COX-2.

Alguns estudos epidemiológicos mostram a correlação entre tabagismo e o desenvolvimento do câncer do colo do útero, com risco duas vezes maior de NIC e carcinoma invasor entre os tabagistas. Os reais mecanismos pelos quais o tabagismo aumenta o risco de câncer do colo do útero não estão completamente elucidados (SOUTHERN e HERRINGTON 1998).

Recentemente, encontrou-se uma quantidade quatro vezes maior da COX-2 em mucosa oral de fumante do que em não fumantes. Estudos *in vitro* demonstram que o tabaco estimula o EGFR levando à transcrição aumentada da COX-2. Dessa

forma, a exposição ao tabaco pode iniciar uma cascata de sinalização onde ocorre a interação das vias de sinalização da COX-2 e EGFR como descrito acima. Vide Figura 8. Estes efeitos podem aumentar a mutagenicidade do tabaco, pois a COX-2 converte os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos do tabaco para metabólitos reativos que provocam danos ao DNA (DANNENBERG et al. 2005; DU et al. 2005; MORAITIS et al. 2005).



Fonte: DANNENBERG et al. (2005).

Figura 8 - Ativação da COX -2 e EGFR pelo tabaco

KULKARNI et al. em 2004 demonstraram que os níveis da COX-2 estão aumentados no câncer de colo do útero em decorrência da ativação da sinalização do EGFR. A expressão sincrônica do EGFR e COX-2 mostrou ser um fator prognóstico independente no câncer do colo do útero, refletindo um fenótipo agressivo com aumento da resistência à radioterapia e quimioterapia (KIM et al. 2004).

A interação entre a sinalização do c-erbB-2 e expressão da COX-2 também foi estabelecida. A superexpressão do c-erbB-2 em epitélio biliar de ratos transgênicos leva ao aumento da COX-2 (SUBBARAMAIAH et al. 2002). Além disso, c-erbB-2 pode diretamente regular a expressão da COX-2 em células do câncer colorretal (VADLAMUDI et al. 1999). A COX-2 é superexpressada em câncer de mama com c-erbB-2 amplificado (SUBBARAMAIAH et al. 2002). O c-erbB-2 expresso no núcleo das células, tem como alvo transcricional a região promotora do gene da COX-2 (WANG et al. 2004). Portanto, COX-2 e c-erbB-2 podem interagir em certas células tumorais para facilitar a oncogênese.

Modelos de progressão tumoral *in vitro* demonstram que as proteínas E6 e E7 do HPV de alto risco podem ativar as vias de sinalização da COX-2, EGFR e c-erbB-2 em ceratinócitos, influenciando diretamente o fenótipo celular. Além disso, verificou-se a existência de uma alça de amplificação das vias carcinogênicas devido à interação entre as vias de sinalização da COX-2, EGFR e c-erbB-2.

Podemos então, a partir das conclusões acima, fazer a hipótese de que COX-2, EGFR e c-erbB-2 podem cooperar com o HPV na progressão de lesões intra-epiteliais para o carcinoma invasor (Figura 9).

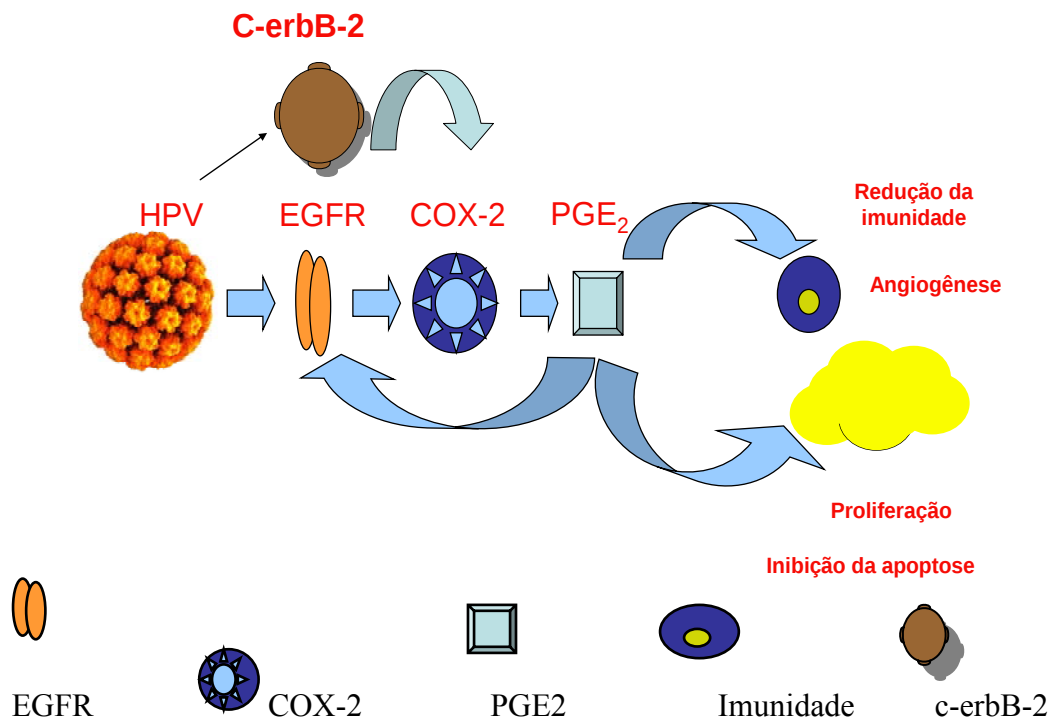


Figura 9 - EGFR, COX - 2 e c-erbB - 2 na carcinogênese HPV mediada.

Não encontramos na literatura estudos que tenham investigado a associação da COX-2, EGFR e c-erbB-2 com os diferentes graus de NIC, durante o processo de progressão do câncer de colo do útero, razão pela qual optamos por este objetivo.

Para verificar a presença do EGFR, c-erbB-2 e COX-2 em tecidos tumorais, investigamos por meio da imunoistoquímica, a expressão destas proteínas em neoplasias intra-epiteliais graus I, II, III e carcinoma epidermóide do colo do útero estágio I.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- 1 Avaliar utilizando-se o método imunoistoquímico a expressão de COX-2, EGFR e c-erbB-2 na progressão do carcinoma epidermóide do colo do útero e
- 2 Avaliar a quantificação da imunomarcação por meio de um método digital assistido por computador.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DE AMOSTRAS E REVISÃO

Os casos foram coletados retrospectivamente, por meio de consulta aos arquivos de anatomia patológica de duas instituições: Hospital AC Camargo e Instituto Brasileiro de Controle ao Câncer (IBCC).

No período de 1985 a 2001, 472 pacientes foram submetidos à biópsia, conização e histerectomia no Departamento de Ginecologia de ambas as instituições. Deste total, 234 casos eram do Hospital AC Camargo e 238 do IBCC.

Os blocos de parafina resgatados dos arquivos foram submetidos a novos cortes e coradas com hematoxilina e eosina (HE). Todas as lâminas foram revisadas por um único patologista do Hospital AC Camargo, para confirmar o diagnóstico. Excluiu-se 59 casos de um total de 255 casos de CEC por não apresentarem material suficiente para o estudo. Em 17 casos encontrou-se somente NIC e estes casos foram estudados como NIC. Em relação aos casos de NIC, de um total de 217 casos, 25 foram excluídos por apresentarem material insuficiente.

No estudo, portanto como fonte final da casuística são 179 casos de CEC e 232 casos de NIC, todos com diagnóstico revisado. Quando houve a existência de mais de um tipo de lesão na mesma lâmina, as diferentes lesões foram consideradas na casuística final.

No exame histológico as lesões intra-epiteliais foram graduadas e categorizadas de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde em NIC

I, NIC II e NICIII. O diagnóstico histológico de CEC foi confirmado em todos os casos de carcinoma invasor, sendo incluídos somente casos com estadiamento clínico I, de acordo com os critérios da FIGO.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital AC Camargo e Instituto Brasileiro de Controle ao Câncer, registro CEP N° 0721/05 e 098/2005/14, respectivamente (Anexo 1 e 2).

Para construir o *tissue microarray* (TMA), uma área representativa das 179 amostras de CEC contendo a lesão foi demarcada. O total de 232 casos de NIC foi estudado em cortes convencionais, pois nas NICs I, II e III encontramos pequenas quantidades de tecido com atipias intra-mucosas que geram representação insuficiente ao longo de cada cilindro.

3.2 CONSTRUÇÃO DO TMA

A partir de uma área previamente definida, o *Tissue Microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, MD) foi utilizado para remover o cilindro de tecido tumoral do bloco doador. O cilindro do tecido com uma dimensão de 1,0mm de cada espécie foi puncionado e disposto em duplicata no bloco de parafina receptor. Cada cilindro foi separado por espaço de 0,2mm. O corte do bloco receptor foi realizado com micrótomo manual e transferido em fita adesiva para lâminas adesivas especiais (Instrumedics Inc, Hackensack, NJ). Por último, a fita adesiva foi retirada pela exposição à luz ultravioleta. As lâminas foram armazenadas cobertas por parafina, embaladas a vácuo e congeladas em freezer a -20°C (Anexo 3). Detalhe do método pode ser visto na revisão realizada por ANDRADE et al. (2007).

3.3 IMUNOISTOQUÍMICA

Efetou-se a imunoistoquímica para COX-2, EGFR e c-erbB-2 em duas lâminas de diferentes níveis do TMA. O corte da segunda lâmina foi obtido com 25 níveis de diferença da primeira, resultando em pelo menos 125µm de distância entre os dois cortes e garantindo amostras celulares diferentes para cada tumor.

As lâminas do TMA foram desparafinadas com 30 minutos de incubação a 60°C lavados em xilol e reidratados em álcool etílico e lavados em água corrente. As lâminas foram processadas, utilizando o método da avidina/biotina imunoperoxidase. Atividade de peroxidase endógena foi bloqueada pela imersão das lâminas em metanol com água oxigenada 3% por 40 minutos. A recuperação antigênica das lâminas tratadas em tampão citrato (pH6. 0) foi realizada por meio do calor úmido em panela de pressão a 98°C por 15 minutos. As lâminas foram bloqueadas por avidina/biotina (*DaKo Biotin Blocking System*) e para proteína (*Dako Protein Block Serum-Free*) por 20 minutos cada.

A imunorreação foi realizada à temperatura ambiente com um anticorpo monoclonal anti-COX-2 (Novocastra, NCL-COX-2), EGFR (Dako, Carpintaria, CA; M3563). Os tecidos foram expostos à IgG biotinilado de camundongo em temperatura ambiente por 20 minutos e então incubados com streptavidina-biotina peroxidase LSAB kit (Dako) por 30 minutos. Finalmente as lâminas foram coradas com 3,3'diaminobenzidina por 3 a 5 minutos, e contra coradas com hematoxilina Harris, e montadas com Permount (Fisher Scientific). O controle negativo foi processado similarmente pela omissão do anticorpo primário e espécimes de biópsia de câncer de mama e cólon foram usadas como controle positivo para, EGFR e

COX-2, respectivamente. Os casos de NIC foram igualmente processados em cortes convencionais. A imunoistoquímica para o c-erbB-2 foi realizada utilizando-se o kit do Hercep Test de acordo com o protocolo do fabricante.

3.4 INTERPRETAÇÃO DAS REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS

A análise da expressão imunoistoquímica das proteínas COX-2, EGFR e c-erbB-2 foi realizada, quantitativamente, por meio do Sistema Automatizado de Imagem Celular (ACIS III DAKO, Carpinteria, CA, EUA). Especificações do aparelho e principais passos na análise do TMA encontram-se nos anexos 4 e 5.

De uma maneira resumida os componentes do ACIS consistem de um microscópio digital automatizado (escaneador de lâminas) e de um computador com janela para captura de imagens e um sistema de processamento das imagens. Cada lâmina corada por imunoistoquímica é digitalizada e as imagens capturadas são revisadas pelo patologista na tela do computador. Um mínimo de seis campos de maior poder de aumento é selecionado pelo patologista. O ACIS é capaz de detectar, contar e classificar células baseadas na cor, tamanho e formato. Este sistema reconhece 256 níveis de intensidade da coloração imunoistoquímica que são convertidos para um escore fracionado da área selecionada. Uma média do escore de todas as áreas também é calculada. Detalhes sobre o “*hardware*” e “*software*” do ACIS são avaliáveis nos trabalhos de BAUER et al. 2000; Wang et al 2001; Sun et al 2002; e Cregger et al. 2006.

Para a análise da expressão de EGFR foi utilizado o programa computacional *membrane histo*, residente no sistema. Este programa faz a análise da densidade

óptica do componente de membrana. Para a análise da expressão de COX-2 foi utilizado o programa computacional *cytoplasma_histo*, igualmente residente no sistema e que mede a intensidade de reação no citoplasma. Finalmente, para a análise da expressão de c-erbB-2 foi utilizado o programa computacional *herceptest*, aprovado pelo *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos da América. O “software” do ACIS fornece um escore combinado que varia de 0-5 que possui correspondência com o escore imunoistoquímico manual (negativo, +1, +2, +3) para os resultados do Herceptest. A mais alta concordância entre microscopia digital e amplificação gênica ocorrem quando a margem de variação de 2,2 é utilizado para o c-erbB-2, portanto o nível de corte adotado neste estudo para casos positivos foi 2,2 (BLOOM e HARRINGTON 2004).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação entre os escores das intensidades de EGFR e COX-2 foi realizada por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para as categorias de c-erbB-2 (positivo e negativo) foi utilizado o teste do qui-quadrado.

O critério de determinação de significância foi o nível de 5%.

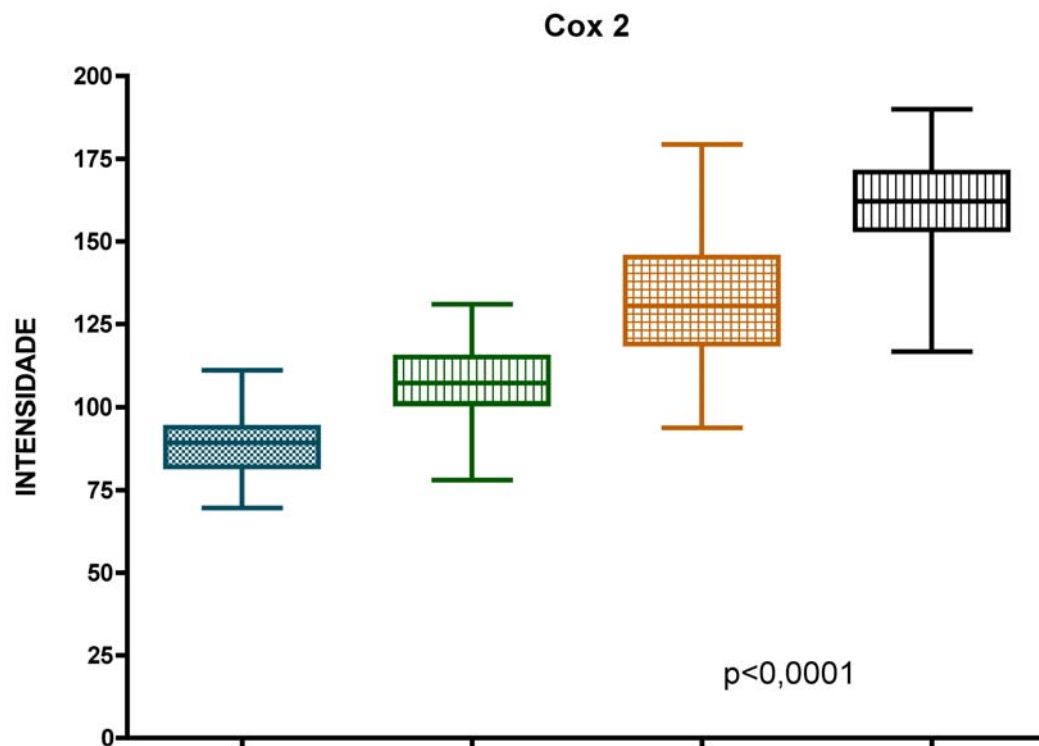
4 RESULTADOS

A avaliação quantitativa foi realizada para intensidade de expressão da COX-2, EGFR e c-erbB-2 e a representação geométrica da relação entre a distribuição da COX-2, EGFR de acordo com a intensidade da reação imunoistoquímica nos diferentes graus da lesão intra-epitelial e carcinoma espinocelular Estádio Clínico I, é apresentado na forma de Box-and-Whisker plot e a intensidade de expressão do c-erbB-2 é apresentada na forma de histograma (Figura 20).

Valores como a mínima, o Percentil 25%, a mediana, o percentil 75%, a máxima, a média e o desvio padrão estão esquematizados juntamente com o Box-plot nas figuras 10 e 14.

4.1 EXPRESSÃO DA COX-2 NA SEQUÊNCIA NIC I, NIC II, NIC III E CARCINOMA INVASOR.

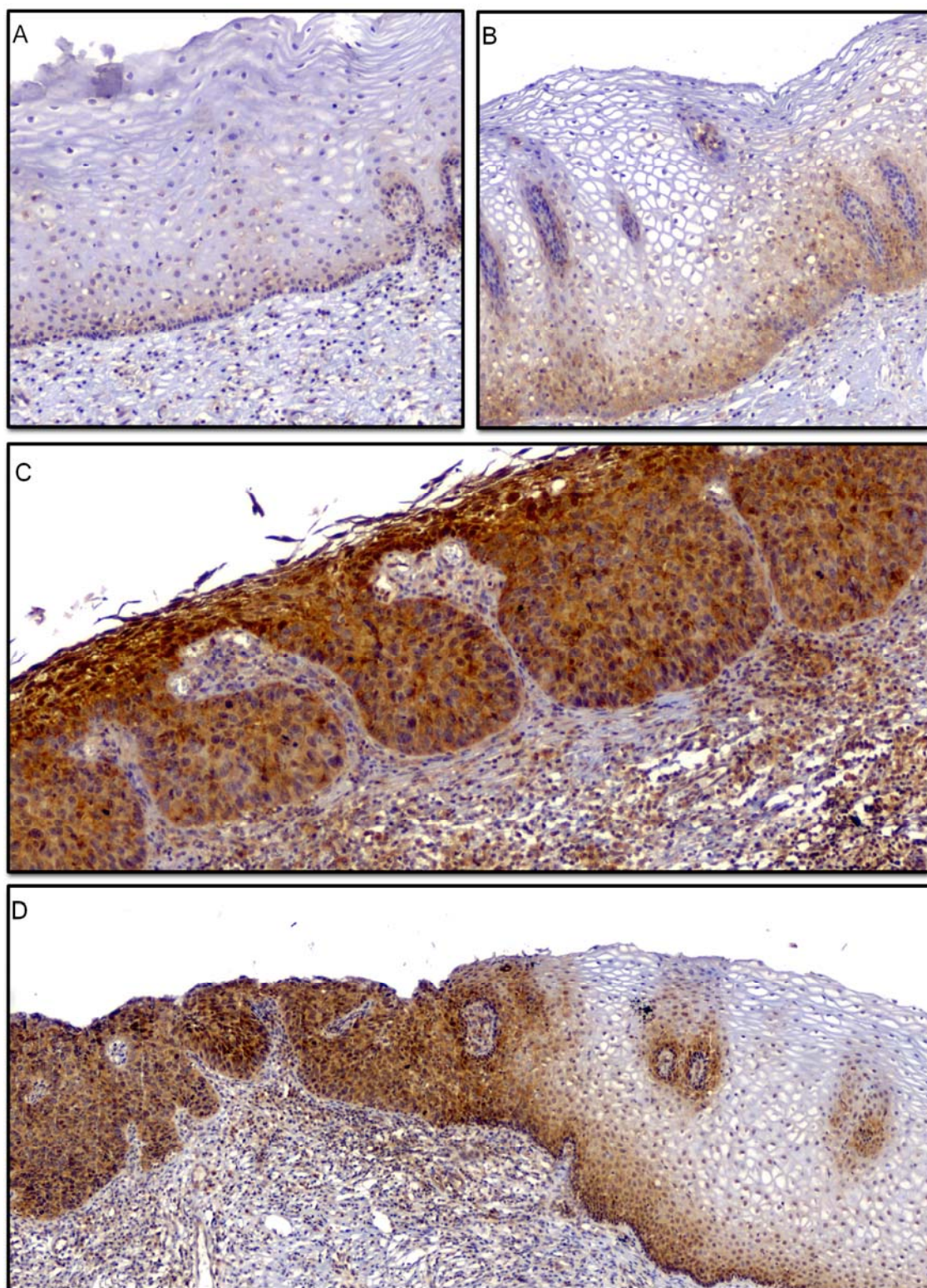
A média da intensidade de expressão da COX-2 aumentou com os diferentes graus da NIC e CEC, com correlação positiva entre expressão da COX-2 e grau de severidade da NIC (Kruskal-Wallis = 374,8; $p < 0,0001$), conforme a Figura 10. As Figuras 11 e 12 ilustram a imunoreatividade da COX-2 na NIC e CEC respectivamente.



	NIC I (Nº=114)	NIC II (Nº=59)	NIC III (Nº=109)	CEC (Nº=174)
Mínima	69,6	78,0	93,8	116,7
Percentil 25%	82,0	101,0	119,0	153,5
Mediana	89,3	107,2	130,5	162,1
Percentil 75%	94,0	115,0	145,2	171,0
Máxima	111,0	131,0	179,3	190,0
Média	88,1	108,0	132,0	161,6
Desvio padrão	8,63	11,0	17,3	13,3

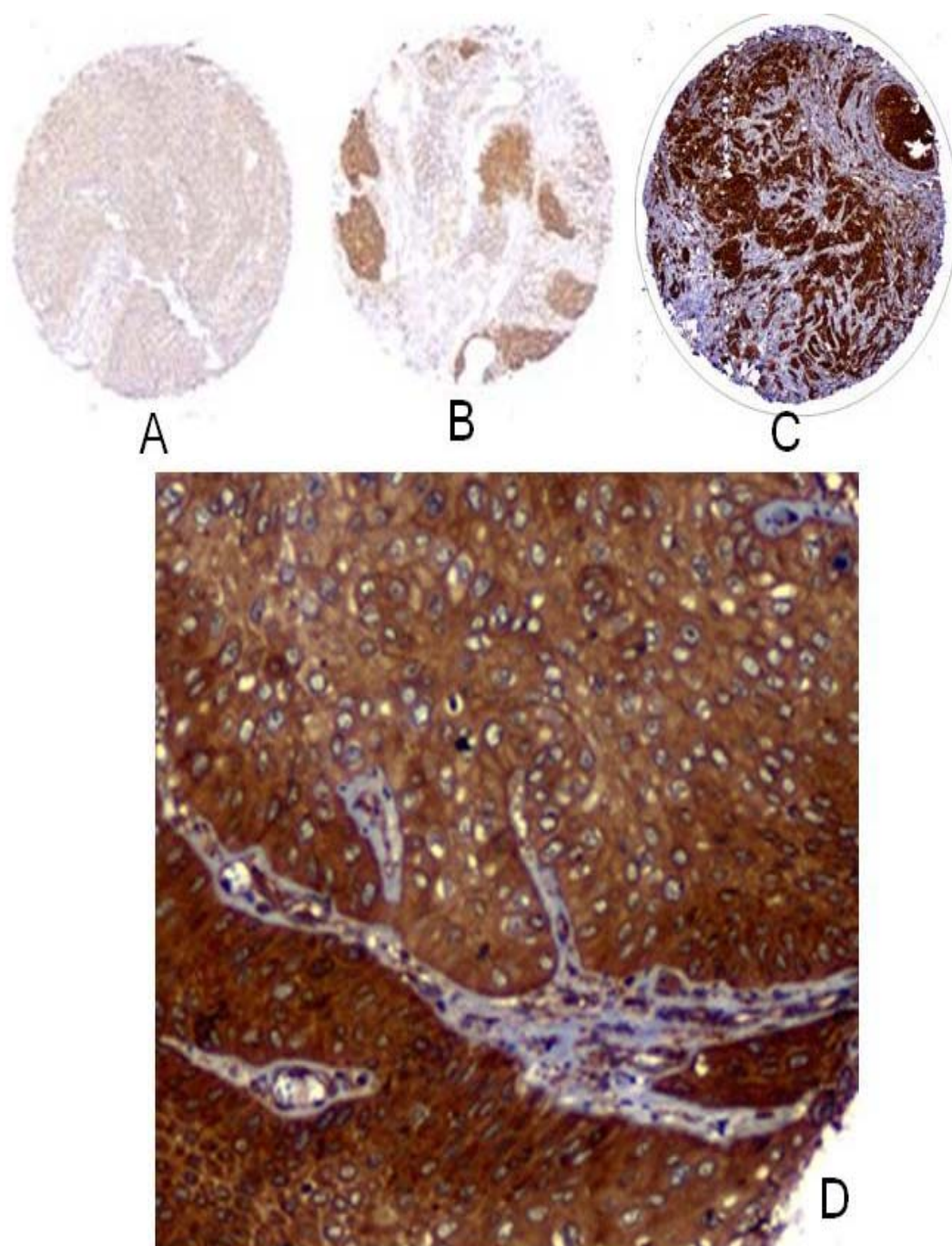
Legenda: COX – Ciclooxigenase; NIC - neoplasia intra-epitelial, Nº-Total de casos.

Figura 10 - COX – 2 e progressão do carcinoma epidermóide do colo do útero.



Legenda: Painel A epitélio normal. Painel B Expressão da COX-2 na NIC I. Painel C NIC III e Painel D demonstra a expressão da COX-2 na transição NIC/CEC microinvasor.

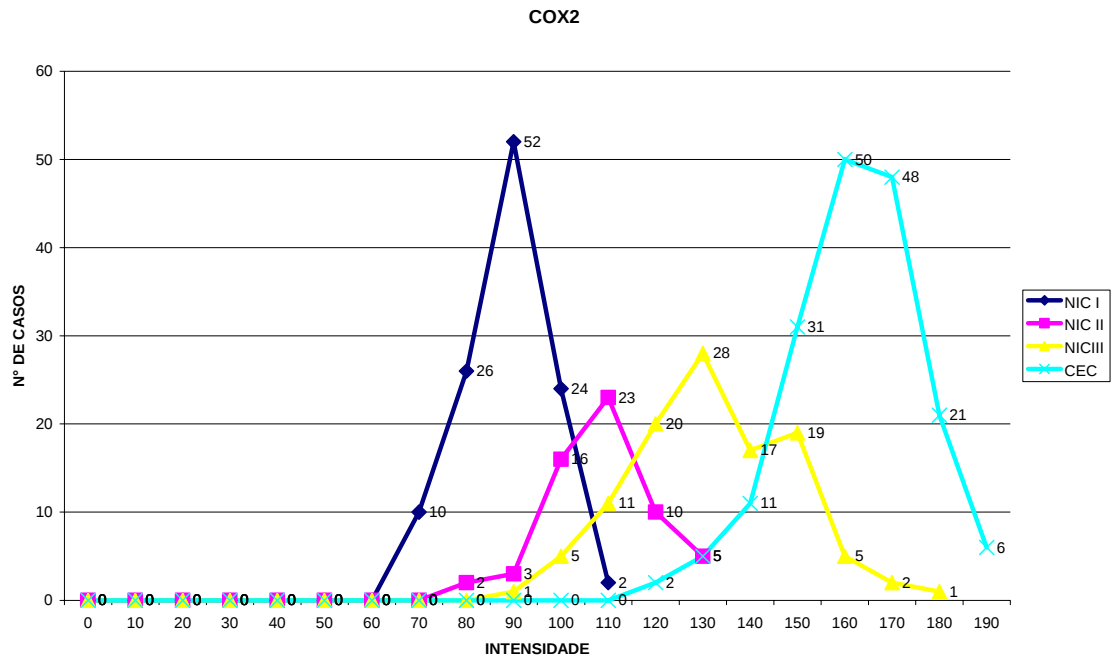
Figura 11 - Intensidade de expressão da COX-2 na NIC.



Legenda: Painei A fraca expressão da COX-2. Painei B e C CEC com forte expressão da COX-2 e Painei D CEC em grande aumento.

Figura 12 - Intensidade de expressão da COX-2 no CEC.

Diferenças na frequência de expressão da COX-2 nas NIC I, II, III e CEC estão representadas na Figura 13.

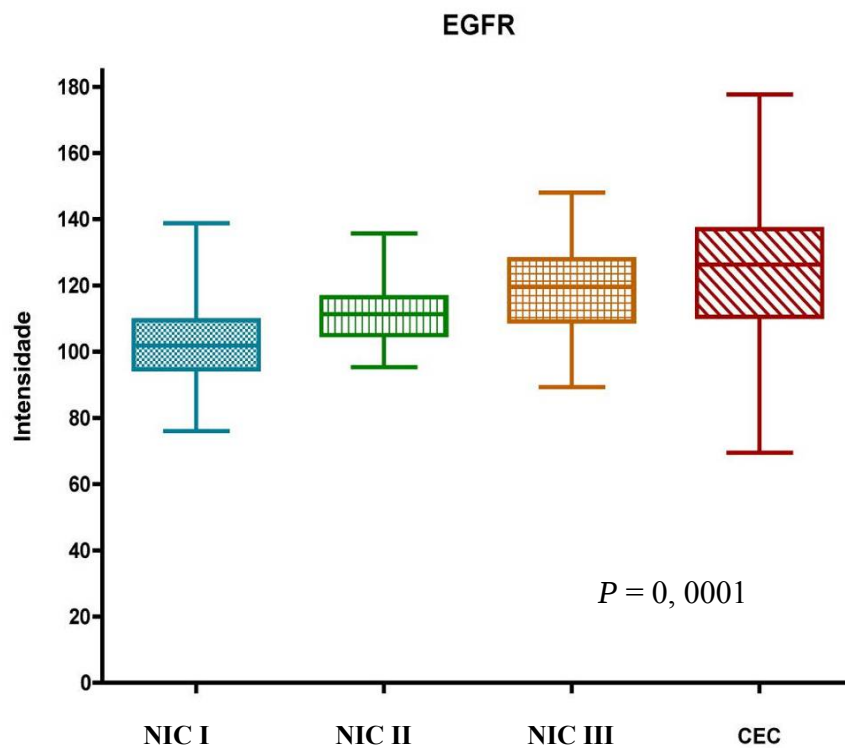


Legenda: COX – Ciclooxigenase; NIC - neoplasia intra-epitelial, N°-Total de casos.

Figura 13 - Frequência de distribuição das NICs e CEC nas diferentes escalas de intensidade de expressão da COX-2.

4.2 EXPRESSÃO DO EGFR NA SEQUÊNCIA NIC I, NIC II, NIC III E CARCINOMA INVASOR

Houve diferença significativamente estatística entre as médias da intensidade de expressão do EGFR de acordo com o grau de severidade das NIC, demonstrando correlação entre a expressão do EGFR e os diferentes estágios das NIC, durante a progressão tumoral (Kruskal-Wallis; $H=118,2$; $P=0,001$) observados na Figura 14.



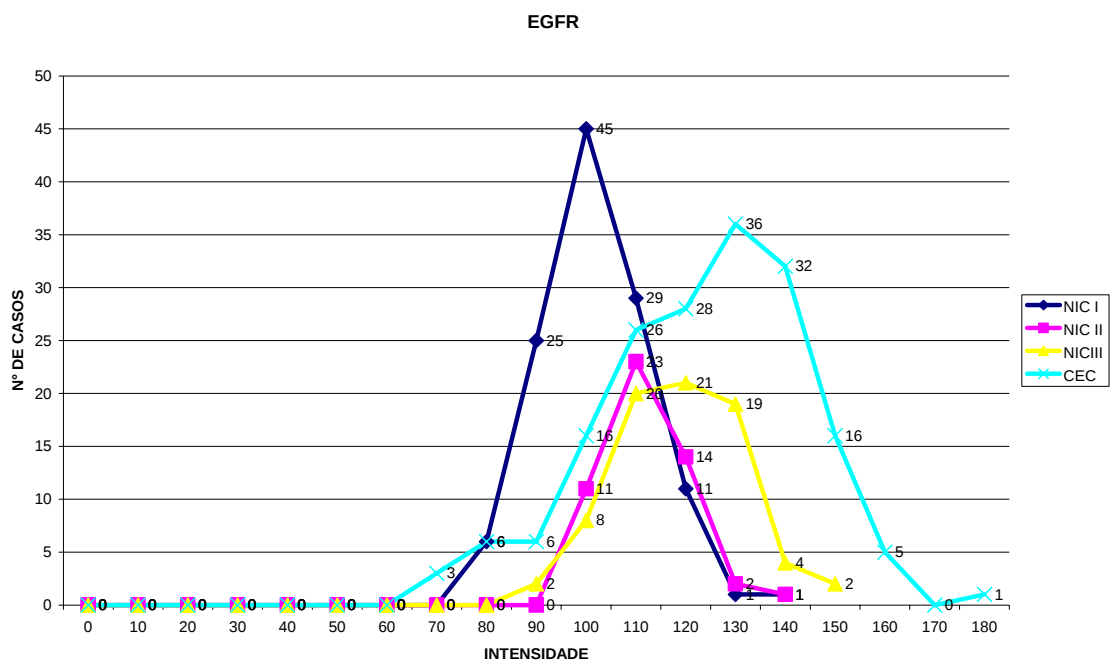
	NIC I (Nº=118)	NIC II (Nº=51)	NIC III (Nº=76)	CEC (Nº=175)
Mínima	76,0	95,3	89,3	69,5
Percentil 25%	94,6	105,0	109,1	110,5
Mediana	101,8	111,3	119,6	126,3
Percentil 75%	109,5	116,5	127,9	137,0
Máxima	138,8	135,7	148,0	177,7
Média	102,1	111,5	118,4	123,2
Desvio padrão	10,9	8,41	12,7	20,3

Legenda: EGFR: receptor do fator de crescimento epidermal; NIC - neoplasia intra-epitelial, CEC Carcinoma espinocelular e *p*: significância estatística. Nº-Total de casos.

Figura 14 - EGFR e Progressão do CEC no Colo Uterino

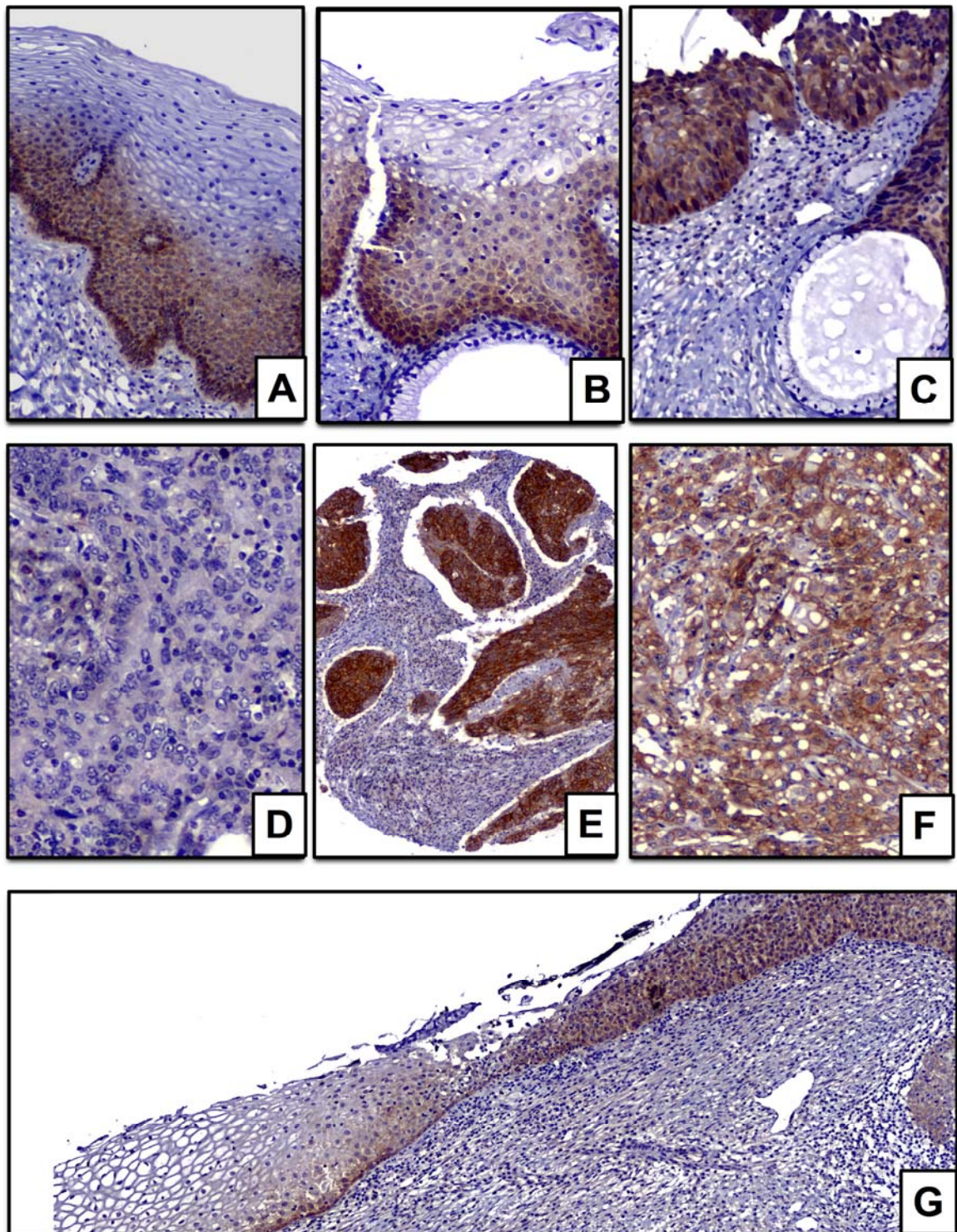
Observou-se imunoreatividade para EGFR na membrana plasmática das células e positividade da coloração ocorreu nas camadas basal e parabasal do epitélio escamoso normal. Durante a progressão de NIC I para o carcinoma invasor foi verificado uma perda da expressão preferencialmente basal para uma distribuição do EGFR através de toda a lesão do epitélio escamoso. A Figura 16 ilustra a imunoreatividade do EGFR nas lesões NIC e no CEC.

Diferenças na frequência de expressão do EGFR nas NIC I, II, III e CEC estão representadas Figura 15.



Legenda: EGFR: receptor do fator de crescimento epidermal; NIC - neoplasia intra-epitelial, CEC Carcinoma espinocelular e N°-Total de casos.

Figura 15 - Frequência de distribuição das NICs e CEC nas diferentes escalas de intensidade de expressão do EGFR.

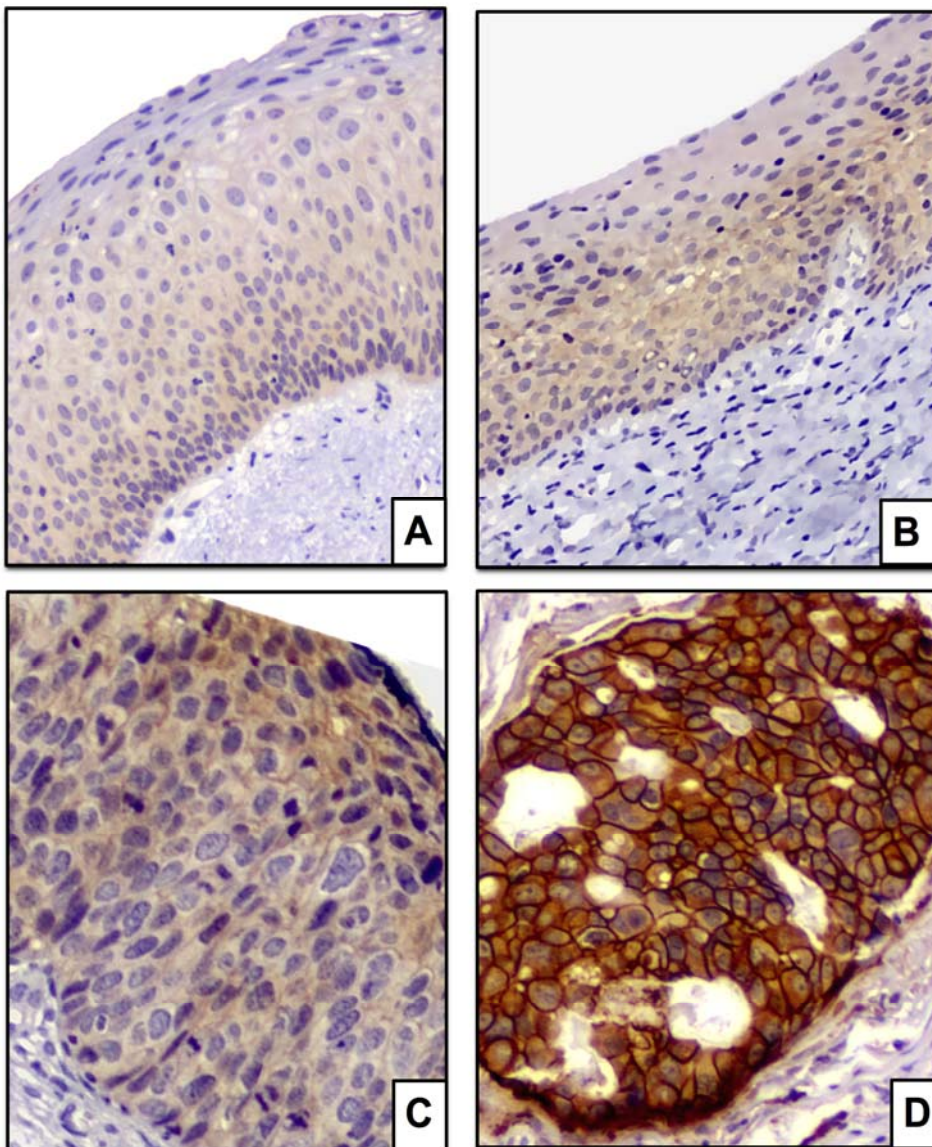


Legenda: Painel A, caso de NIC I onde somente a camada proliferativa demonstra expressão protéica. O mesmo se observa no painel B em um caso de NIC II. O Painel C mostra a expressão do EGFR na NIC III. Painel D demonstra um caso de CEC negativo. No Painel E representa uma visão panorâmica de CEC positivo e o Painel F CEC positivo em grande aumento. O Painel G demonstra a expressão do EGFR na transição de NIC I para NIC III.

Figura 16 - Expressão do EGFR durante a progressão do câncer do colo do útero

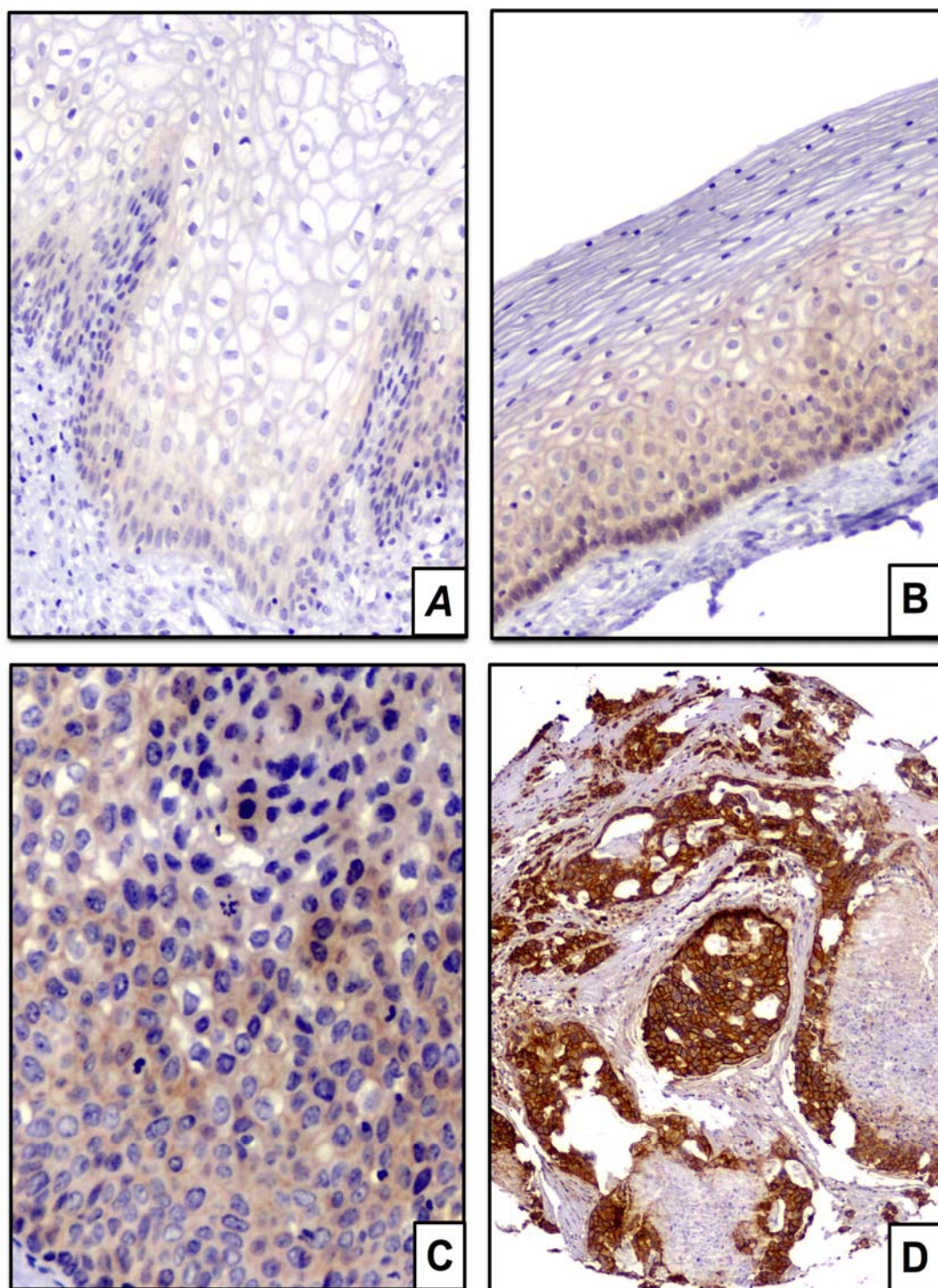
4.3 EXPRESSÃO DE c-erbB-2 NA SEQUÊNCIA NIC I, NIC II, NIC III CARCINOMA INVASOR

A positividade ou negatividade das reações foi evidenciada pela presença ou não de coloração marrom escura com padrão de membrana citoplasmática, delineando toda a circunferência dos limites celulares (Figuras 17 e 18).



Legenda: Painel A demonstra escore de 0,6 para c-erbB-2 (NIC III). Escore de 1,6 é observado no Painel B (NICIII). O Painel C mostra a expressão do c-erbB-2 com escore de 2,1 (CEC) e o Painel D demonstra um caso de escore 4,3 (CEC).

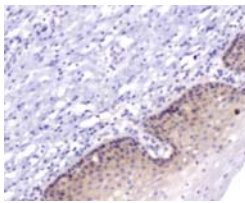
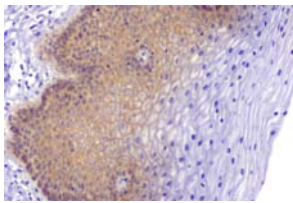
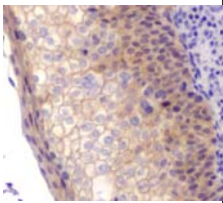
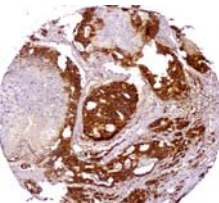
Figura 17 – Exemplos de escore imunoistoquímico do c-erbB-2.



Legenda: Painel A demonstra expressão negativa do c-erbB-2 na NIC I. Painel B expressão do c-erbB-2 na NIC II. O Painel C mostra a expressão do c-erbB-2 em maior aumento no CEC e no Painel D uma visão panorâmica.

Figura 18 – Expressão do c-erbB-2 na NIC e CEC.

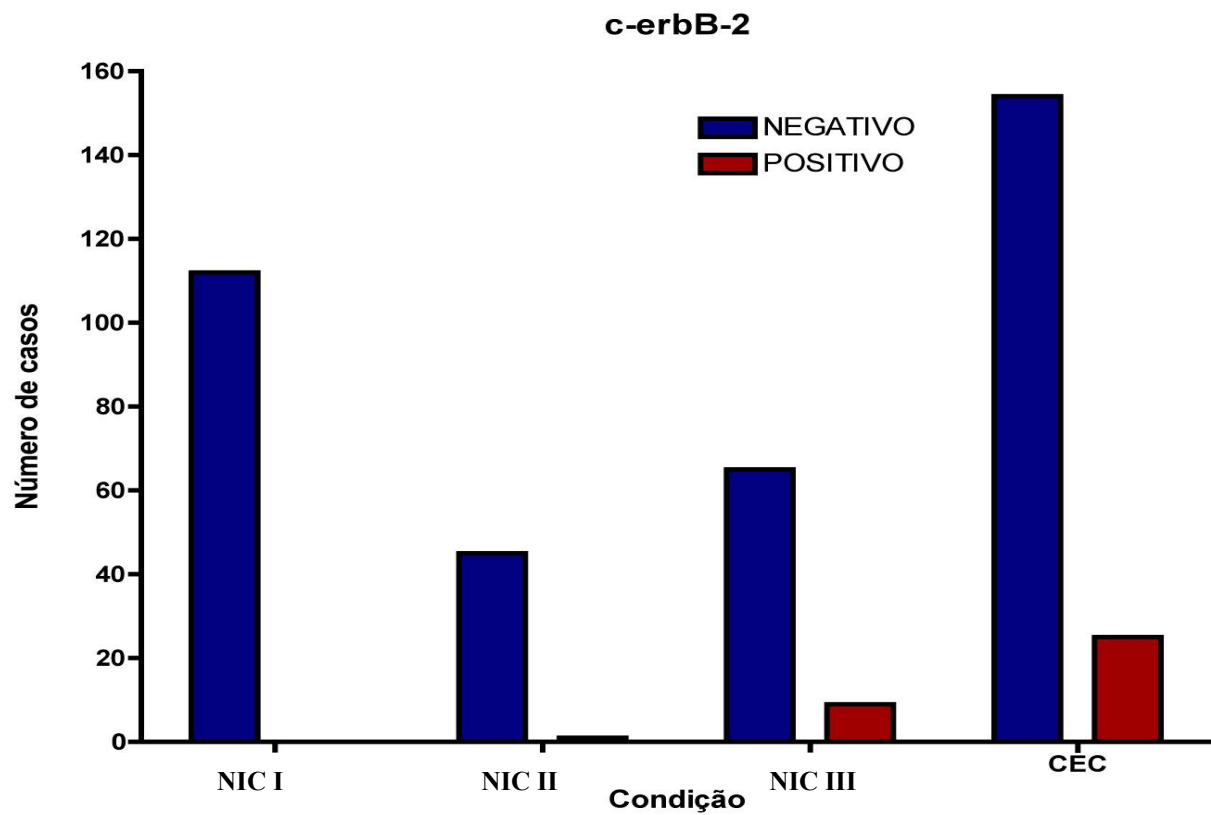
A expressão do c-erbB-2 foi negativo para NIC I, com positividade 2,22% para NIC II, 14,06% para NIC III e 16,23% para CEC. Apesar da baixa frequência de expressão do c-erbB-2, houve uma correlação positiva entre a expressão do c-erbB-2 e severidade da doença na transição de NIC III para CEC $p < 0,001$ (Figuras 19 e 20).

						
NIC I		NIC II		NIC III		CEC
NEG	112	45		64		154
POS	0	1		9		25
%POS	0	2,22		14,6		16,23

$P < 0,0001$ (calculado pelo X^2).

Legenda: c-erbB-2-: receptor do fator de crescimento epidermal humano; NIC neoplasia intra-epitelial, CEC Carcinoma espinocelular e p : significância estatística; Número de casos negativos, POS- Número de casos positivos, %POS- Porcentagem de caso positivos.

Figura 19 - Porcentagem de expressão do c-erbB-2 nos diferentes graus de NIC e CEC



Legenda: c-erbB-2- receptor do fator de crescimento epidermal humano; NIC - neoplasia intra-epitelial e CEC - Carcinoma espinocelular.

Figura 20 - Expressão do c-erbB-2 nos diferentes graus de NIC e CEC

5 DISCUSSÃO

Após mais de 20 anos de investigações sobre a associação existente entre o HPV e o carcinoma epidermóide do colo do útero, poucas dúvidas nos restam a respeito do papel central deste vírus na carcinogênese cervical, apesar de este assunto estar longe de ser totalmente elucidado (STANLEY 2001; DOORBAR 2005; SNIJDERS et al. 2006; BOCCARDO e VILLA 2007).

Avanços foram realizados nos últimos anos e resultados obtidos dos estudos de carcinogênese *in vitro* do colo do útero, permitiram uma melhor compreensão dos fatores que interagem em menor ou maior intensidade com as oncoproteínas E6/E7 do HPV, potencializando a ação do vírus na célula hospedeira e facilitando o desenvolvimento dos processos de imortalização e carcinogênese (SNIJDERS et al. 2006).

Apesar de dados experimentais *in vitro* apontarem a COX-2, o EGFR e o c-erbB-2 como fatores que interagem com as proteínas E6/E7 do HPV, constituindo importante via carcinogênica no colo do útero (AKERMAN et al. 2001; NARISAWA-SAITO et al. 2007; SUBBARAMAIAH e DANNENBERG 2007), estudos em amostras teciduais emblocados em parafina, não demonstraram correlação entre a presença do HPV e a expressão do EGFR (CHAPMAN et al., 1992), COX-2 (KIM et al. 2003; SARIAN et al. 2006; SALDIVAR et al. 2007) e c-erbB-2 (NGAN et al. 2001).

A falta de correlação entre a presença do HPV e expressão de EGFR, COX-2 e c-erbB-2 pode ser explicado pelo fato do carcinoma epidermoide do colo do útero

originar-se na maioria das vezes da junção escamo-colunar (WRIGHT e FERENCZY 2002; DOORBAR 2006; SCHIFFMAN et al. 2007). Esta região sofre alterações constantes determinados pelos hormônios sexuais e pela resposta adaptativa e patológica dos tecidos a várias agressões, incluindo os agentes infecciosos sexualmente transmissíveis (por exemplo: herpes simples, tricomonas, clamídia e gardnerella) (SARIAN et al. 2006). Desta forma a expressão da COX-2, EGFR e c-erbB-2 podem ser ativadas por outros mecanismos do que a carcinogênese HPV induzida.

Portanto precauções são necessárias quando se transporta resultados *in vitro* para modelos *in vivo*, devido à ocorrência de mecanismos regulatórios variados ainda não conhecidos.

A participação exata da COX-2, EGFR e c-erbB-2 no processo carcinogênico e como isto ocorre *in vivo* são pontos a serem esclarecidos.

Este estudo demonstrou que a COX-2, EGFR e c-erbB-2 apresentam gradiente de expressão crescente durante a transição das neoplasias intra-epiteliais para o carcinoma epidermóide invasivo, portanto, estas proteínas podem estar envolvidas na carcinogênese do colo do útero.

Há uma grande variação nos resultados da imunoistoquímica para COX-2, EGFR e c-erbB-2 entre diferentes estudos na literatura. A expressão da COX-2 variou de 44-72% para o CEC (KIM et al. 2005; MANCHANA et al. 2006; ATHAVALE et al. 2006; DURSUN et al. 2007) e de 24-67% para NIC (FARLEY et al. 2004, KIM et al. 2005, DURSUN et al. 2007). Em relação ao EGFR a expressão variou de 6-91% para os casos de CEC (KERSEMAEKERS et al. 1999a e b; KRISTENSEN et al. 1996; OH et al. 2000; KIM et al. 2002) e 30-70% para as NICs (BERCHUCK et al.

1990; BOIKO et al. 1998; MARUO et al. 1992, DELLAS et al. 1996; CHANG et al. 1999; MAYER et al. 2000; MATHUR et al. 2001). Para o c-erbB-2, os casos de CEC apresentaram variação de 4-75% na sua expressão (OKA et al. 1994; KRISTENSEN et al. 1996; KERSEMAEKERS et al. 1999^a; CHANG et al. 2001; NGAN et al. 2001; BELLONE et al. 2003) e a expressão nas NICs variou de 0-33% (KIM et al. 2005).

A análise imunoistoquímica é amplamente utilizada no diagnóstico laboratorial, principalmente como método qualitativo para produzir resultados positivos ou negativos. Contudo, os métodos imunoistoquímicos analisados de forma qualitativa, têm apresentado grande disparidade e variabilidade de resultados entre diferentes observadores (WANG et al. 2001; CREGGER et al. 2006). Dentre os fatores que explicam estas discrepâncias está a falta de padronização dos protocolos de imunoistoquímica como, método de fixação e processamento do espécime, de recuperação antigênica e escolha do anticorpo. Outro importante fator é que a quantificação imunoistoquímica manual é intrinsecamente subjetiva e que, associa a convencional fração de células marcadas com os escores de intensidade do imunoexpresso, com base na observação visual qualitativo (WANG et al. 2001; CREGGER et al. 2006).

Atualmente é possível obter a determinação quantitativa por meio da análise automatizada de imagem, esse método tem sido altamente validado devido aos resultados precisos quando comparados aos métodos de escore semiquantitativo (BAUER et al, 2000; WANG et al. 2001; BLOOM e HARRINGTON 2004; CREGGER et al. 2006).

Os resultados alcançados com o emprego do método digital podem resolver a discordância entre diferentes observadores com relação à intensidade de

imunomarcação. Além disso, o método proposto não categoriza os resultados em grupos, o que torna a análise imunoistoquímica numericamente mensurável individualmente, aumentando seu poder diagnóstico (BAUER et al, 2000; WANG et al. 2001; BLOOM e HARRINGTON 2004). Todavia existem algumas limitações como o alto preço do equipamento que pode ser a causa da lenta implementação dessa metodologia nos laboratórios de patologia (WANG et al. 2001).

O presente estudo demonstrou que a análise de imagens pelo ACIS III é particularmente útil por que realiza análises rápidas e confiáveis, não requerendo pessoal com alta especialização em análise de imagens ou informática. A utilização desta técnica somado ao número de casos significativamente estatístico para cada variável estudada permitiram concluir que COX-2, EGFR e c-erbB-2 podem estar relacionados com a carcinogênese do colo do útero.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os dados quantitativos obtidos neste estudo, pode-se constatar que COX-2, EGFR e c-erbB-2 podem participar da progressão do câncer do colo do útero, e que o sistema de análise de imagens utilizado (ACIS III) demonstrou ser eficaz na quantificação da expressão de COX-2, EGFR e c-erbB-2 pela técnica de imunoistoquímica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[Anonymus] Technology, products, markets and service opportunities: the epidermal growth factor receptor (EGFr) pathway in cancer. **Future Oncol** 2007; 3:1921-56.

Akerman GS, Tolleson WH, Brown KL, et al. Human Papillomavirus type 16 E6 and E7 cooperate to increase epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA levels, overcoming mechanisms by which excessive EGFR signaling shortens the life span of normal human keratinocytes. **Cancer Res** 2001; 61:3837-43.

Andrade VP, Cunha IW, Silva EM et al. O arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **Bras Patol Med Lab** 2007; 43:55-60

Athavale R, Clooney K, O'Hagan J, Shawki H, Clark AH, Green JA. COX-1 and COX-2 expression in stage I and II invasive cervical carcinoma: relationship to disease relapse and long-term survival. **Int J Gynecol Cancer** 2006, 16:1303-8.

Bauer KD, de la Torre-Bueno J, Diel IJ, et al. Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging. **Clin Cancer Res** 2000; 6:3552-9.

Bellone S, Palmieri M, Gokden M, et al. Selection of HER-2/neu-positive tumor cell in early stage cervical cancer: implications for Herceptin-mediated therapy. **Gynecol Oncol** 2003; 91:231-40.

Berchuck A, Rodriguez G, Kamel A, Soper T, Clarke-Pearson DL, Bast RC. Expression of epidermal growth factor receptor and Her-2/Neu in normal and neoplastic cervix, vulva and vagina. **Obstet Gynecol** 1990, 3:381-7.

Bloom K, Harrington D. Enhanced accuracy and reliability of HER-2/ neu immunohistochemical scoring using digital microscopy. **Am J Clin Pathol** 2004; 121:620-30.

Boccardo E, Villa LL. Viral origins of human cancer. **Curr Med Chem** 2007; 14:2526-39.

Boiko IV, Mitchell MF, Hu W, et al. Epidermal growth factor receptor expression in cervical intraepithelial neoplasia and its modulation during an α -difluoromethylornithine chemoprevention trial. **Clin Cancer Res** 1998; 4:1383-91.

Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. **Int J Biochem Cell Biol** 2007; 39:2006-11.

Chang JL, Tsao YP, Liu DW, Han CP, Lee WH, Chen SL. The expression of type I growth factor receptors in the squamous neoplastic changes of uterine cervix. **Gynecol Oncol** 1999; 73:62-71.

Chang JL, Tsao YP, Liu DW, Huang SJ, Lee WH, Chen SL. The Expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix. **J Biomed Sci** 2001; 8:206-13.

Chapman WB, Lorincz AT, Willett GD, Wright VC, Kurman RJ. Epidermal growth factor receptor expression and the presence of human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. **Int J Gynecol Pathol** 1992; 11:221-6.

Chun KS, Surh, YJ. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase – 2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. **Bioch Pharmacol** 2004; 68:1089-100.

Cregger M, Berger AJ, Rimm DL. Immunohistochemical and quantitative analysis of protein expression. **Arch Pathol Lab Med** 2006; 130:1026-30.

Dannenber AJ, Lippman SM, Mann JR, Subbaramaiah K, Dubois RN. Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention. **J Clin Oncol** 2005; 23:254-64.

Dai Y, Zhang X, Peng Y, Wang Z. The expression of cyclooxygenase-2, VEGF and PGs in CIN and cervical carcinoma. **Gynecol Oncol** 2005; 97:96-103.

Dellas A, Schultheiss E, Almendral AC, Torhorst J, Gudat F. Assessment of EGFR and TGF-Alpha expression in relationship to HPV and KI-67 distribution in cervical intraepithelial neoplasms. **Int J Cancer (Pred Oncol)** 1996; 69:165-9.

Dicker AP. **Use of novel drugs in combination with radiation therapy. Role of extracellular matrix in radiation response: clinical drug development with radiation therapy.** Available from: <URL:<http://Kimmelcancercenter.org/RadOnc/bio2.htm>> [2006 Oct. 15].

Doorbar J. The papillomavirus life cycle. **J Clin Virol** 2005; 32(Suppl 1):S7-15.

Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clin Sci (Lond)** 2006; 110:525-41.

Dorsan RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. **Nat Rev Cancer** 2007; 7:79-94.

Du B, Alkatorki NK, Kopelovich L, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Tobacco smoke stimulates the transcription of amphiregulin in human oral epithelial cells: evidence of a cAMP-responsive element binding protein-dependent mechanism. **Cancer Res** 2005; 65:5982-8.

Dursun P, Yuce K, Usubutun A, Ayhan A. Cyclooxygenase-2 expression in cervical intraepithelial neoplasia III and squamous cell cervical carcinoma, and its correlation with clinic pathologic variables. **Int Gynecol Cancer** 2007; 17:164-73.

Farley J, Uyehara C, Hashiro G, Belnap C, Birrer M, Salminen E. Cyclooxygenase-2 expression predicts recurrence of cervical dysplasia following loop electrosurgical excision procedure. **Gynecol Oncol** 2004; 92:596-602.

Fosslien E. Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. **Crit Rev Clin Labor Sciences** 2000; 37:431-502.

Giltane JM, Rimm DL. Technology insight: identification of biomarkers with tissue microarray technology. **Nat Clin Pract Oncol** 2004; 1:104-11.

Grandis JR, Sok JC. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. **Pharmacol Ther** 2004; 102:37-46.

Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:361-70.

Hu G, Liu W, Mendelsohn J, Ellis LM, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and human papillomavirus E6/E7 proteins in cervical carcinoma cells. **J Natl Cancer Inst** 1997; 89:1271-6.

Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of target inhibitors. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:341-54. Erratum in: **Nat Rev Cancer** 2005; 5:580.

Kersemaekers AM, Fleuren GJ, Kenter GG, et al. Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. **Clin Cancer Res** 1999a; 5:577-86.

Kersemaekers AM, Van de Vijver MJ, Kenter GG, Fleuren GJ. Genetic alterations during the progression of squamous cell carcinomas of the uterine cervix. **Genes Chrom Cancer** 1999b, 26:346-54.

Kim GE, Kim YB, Cho NH, et al. Synchronous coexpression of epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 in carcinomas of the uterine cervix: a potential predictor of poor survival. **Clin Cancer Res** 2004; 10:1366-4.

Kim JY, Lim SJ, Park K, Lee CM, Kim J. Cyclooxygenase-2 and c-erbB-2 expression in uterine cervical neoplasm assessed using tissue microarrays. **Gynecol Oncol** 2005; 97:337-41.

Kim MH, Seo S-S, Song Y-S, et al. Expression of cyclooxygenase -1 and -2 associated with expression of VEGF in primary cervical cancer and at metastatic lymph nodes. **Gynecol Oncol** 2003; 90:83-90.

Kim YT, Park SW, Kim JW. Correlation between expression of EGFR and the prognosis of patients with cervical carcinoma. **Gynecol Oncol** 2002; 87:84-9.

Kristensen GB, Holm R, Abele VMR, Trope CG. Evaluation of the prognostic significance of cathepsin D, epidermal growth factor receptor, and c-erbB-2 in early cerv squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. **Cancer** 1996; 78:433-40.

Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, et al. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. **Clin Cancer Res** 2001; 7:429-34.

Lippman SM, Gibson N, Subbaramaiah K, Dannanberg AJ. Combined targeting of the epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase - 2 pathways. **Clin Cancer Res** 2005; 11:6097-9.

Longworth MS, Laimonis LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. **Microbiol Mol Biol Rev** 2004; 68:362-72.

Manchana T, Triratachat S, Sirisabya N, Vasunatna A, Termrungruanglert W, Tresukosol D. Prevalence and prognostic significance of COX-2 expression in stage IB cervical cancer. **Ginecol Oncol** 2006; 100:556-60.

Mann JR, Backlund MG, Dubois RN. Mechanisms of disease: inflammatory mediators and cancer prevention. **Nat Clin Pract Oncol** 2005; 2:202-10.

Maruo T, Yamasaki M, Ladines-Llave CA, Mochizuki M. Immunohistochemical demonstration of elevated expression of epidermal growth factor receptor in neoplastic changes of cervical squamous epithelium. **Cancer** 1992; 69:1182-7.

Mathur SP, Mathur RS, Rust PF, Young RC. Human papilloma virus (HPV)-E6/E7 and epidermal Growth factor receptor (EGF-R) protein levels in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia (CIN). **Am J Reprod Immunol** 2001; 46:280-7.

Mayer TJ, Fraumeni JF, Meyers C. Expression of epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptors during cervical carcinogenesis. **In Vitro Cell Dev Biol-Animal** 2000; 36:667-76.

McCance DJ. Human papillomaviruses and cell signaling. **Sci STKE** 2005; 14:29.

Meert AP, Verdebout JM, Martin B, Ninane V, Feoli F, Sculier JP. Epidermal growth factor receptor expression in pre-invasive and early invasive bronchial lesions. **Eur Respir J** 2003; 21:611-5.

Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2007.

Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. **Oncogene** 2007; 26:6469-87.

Moraitis D, Du B, Lorenzo MS, Boyle JO, Weksler BB. Levels of cyclooxygenase-2 are increased in oral mucosa of smokers: evidence for the role of epidermal growth factor receptor and its ligands. **Cancer Res** 2005; 65:664-70.

Moustafa AE, Foulkes WD, Benlimame N, et al. E6/E7 proteins of HPV type 16 and ErbB-2 cooperate to induce neoplastic transformation of primary normal oral epithelial cells. **Oncogene** 2004; 23:350-8.

Nair P. Epidermal growth factor receptor family and its role in cancer progression. **Curr Science** 2005; 6:890-8.

Narisawa-Saito M, Handa K, Yugawa T, Ohno S, Fujita M, Kiyono T. HPV16 E6-mediated stabilization of ErbB2 in neoplastic transformation of human cervical keratinocytes. **Oncogene** 2007; 26: 2988-96.

Ngan HY, Cheung AN, Liu SS, Cheng DK, Ng TY, Wong LC. Abnormal expression of epidermal growth factor receptor and erbB-2 in squamous cell carcinoma of the cervix: correlation with human papillomavirus and prognosis. **Tumour Biol** 2001; 22:176-83.

Oh MJ, Choi JH, Kim IH, et al. Detection of epidermal growth factor receptor in the serum of patients with cervical carcinoma. **Clin Cancer Res** 2000; 6:4760-63.

Oka K, Nakano T, Arai T. c-erbB-2 oncoprotein expression is associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the cervix. **Cancer** 1994; 73:668-71.

Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. **Int J Gynecol Pathol** 1993; 12:186-92.

Palo G, Chanen W, Dexeus S. **Patologia e tratamento do trato genital inferior**. Rio de Janeiro: MEDSI; 2002. Neoplasia intraepitelial cervical; p.63-90.

Rodríguez I, Kazkin M, Holloschi A, et al. Hyperosmotic stress induces phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂ in HaCat cells by an epidermal growth factor receptor-mediated process. **Cell Signall** 2002; 14:839-48.

Saldivar JS, Lopez D, Feldman R, et al. COX-2 overexpression as a biomarker of early cervical carcinogenesis: a pilot study. **Gynecol Oncol** 2007;S155-62.

Sarian LO, Derchain SF, Yoshida A, Vassallo J, Pignataro F, Andrade LALA. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and Ki67 as related to disease severity and HPV detection in squamous lesions of the cervix. **Gynecol Oncol** 2006, 102:537-41.

Schiffman M, Castle PE, Jeronimo JJ, Rodrigues AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet** 2007; 370:890-907.

Snijders P, Steenbergen RDM, Heideman DAM, Meijer C. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. **J Pathol** 2006; 208:152-64.

Southern SA, Herrington CS. Molecular events in uterine cervical cancer. **Sex Transm Inf** 1998; 74:101-9.

Stanley MA. Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** 2001; 15:663-76.

Subbaramaiah K, Norton L, Gerald W, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 is over expressed in HER-2/neu-positive breast cancer. **J Biol Chem** 2002; 277:18649-57.

Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. **Trends Pharmacol Sci** 2003; 2:96-102.

Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 transcription is regulated by human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins: evidence of a corepressor/coactivator exchange. **Cancer Res** 2007; 67:3976-85.

Sun W, Zhang PL, Herrera G. p53 protein and Ki 67 overexpression in urothelial dysplasia of bladder. **Appl Immunohistochem Molecul Morphol** 2002; 10:327-31.

Tanabe T, Tohnai N, Cyclooxygenase an their gene structures and expression. **Prostaglandins Other Lipid Mediat** 2002; 68-69, 95-114.

Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. **Annu Rev Med** 2002; 53:35-57.

Vadlamudi R, Mandal M, Adam L, Steinbach G, Mendelsohn J, Kumar R. Regulation of Cyclooxygenase -2 pathway by HER2 receptor. **Oncogene** 1999; 18:305-14.

Villa LL. Biology of genital human papillomaviruses. **Int J Gynecol Obstetr** 2006; 94(Suppl 1):S3-7.

Wang S-C, Lien H-C, Xia W, et al. Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2. **Cancer Cell** 2004; 6:251-61.

Wang S, Saboorian H, Frenkel EP, et al. Automated cellular imaging system (ACIS) - assisted quantitation of immunohistochemical assay achieves high accuracy in comparison with fluorescence in situ hybridization assay as the standard. **Am J Clin Pathol** 2001; 116:495-503.

Woodworth CD, Gaiotti D, Michael E, Hansen L, Nees M. Targeted disruption of the epidermal growth factor receptor inhibits development of papillomas and carcinomas from human papillomavirus-immortalized keratinocytes. **Cancer Res** 2000, 60:4397-402.

Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nat Rev Cancer** 2007; 7:11-22.

Wright TC, Ferenczy A. Anatomy and histology of cervix. In: Kurman RJ, editors. **Blaustein's pathology of the female genital tract**. Baltimore: Springer; 2002. p.207-24.

Wright TC, Ferenczy A, Kurman RJ. Precancerous lesions of the cervix. In: Kurman RJ, editors. **Blaustein's pathology of the female genital tract**. Baltimore: Springer; 2002. p.253-324.

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signaling network. **Mol Cell Biol** 2001; 21:127-37.

Yasmeen A, Hosein AN, Yu Q, Moustafa AE. A critical role for D-type cyclins in cellular transformation induced by E6/E7 of human papillomavirus type 16 and E6/E7/ErbB-2 cooperation. **Cancer Sci** 2007; 98:1-5.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente



São Paulo, 28 de setembro de 2005.

À
Dra. Elza Mieko Fukazawa

Ref.: Projeto de Pesquisa n.º 721/05
"Análise de expressão de cox-2, EGFR e c-erbB-e em câncer de colo do útero e lesões pré neoplásicas".

Prezada Doutora:

Os membros da Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital do Câncer em sua reunião de 27/09/2005, **aprovaram** o estudo em referência, porém existe a necessidade de esclarecimentos, conforme parecer consubstanciado em anexo.

Atenciosamente,


Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa

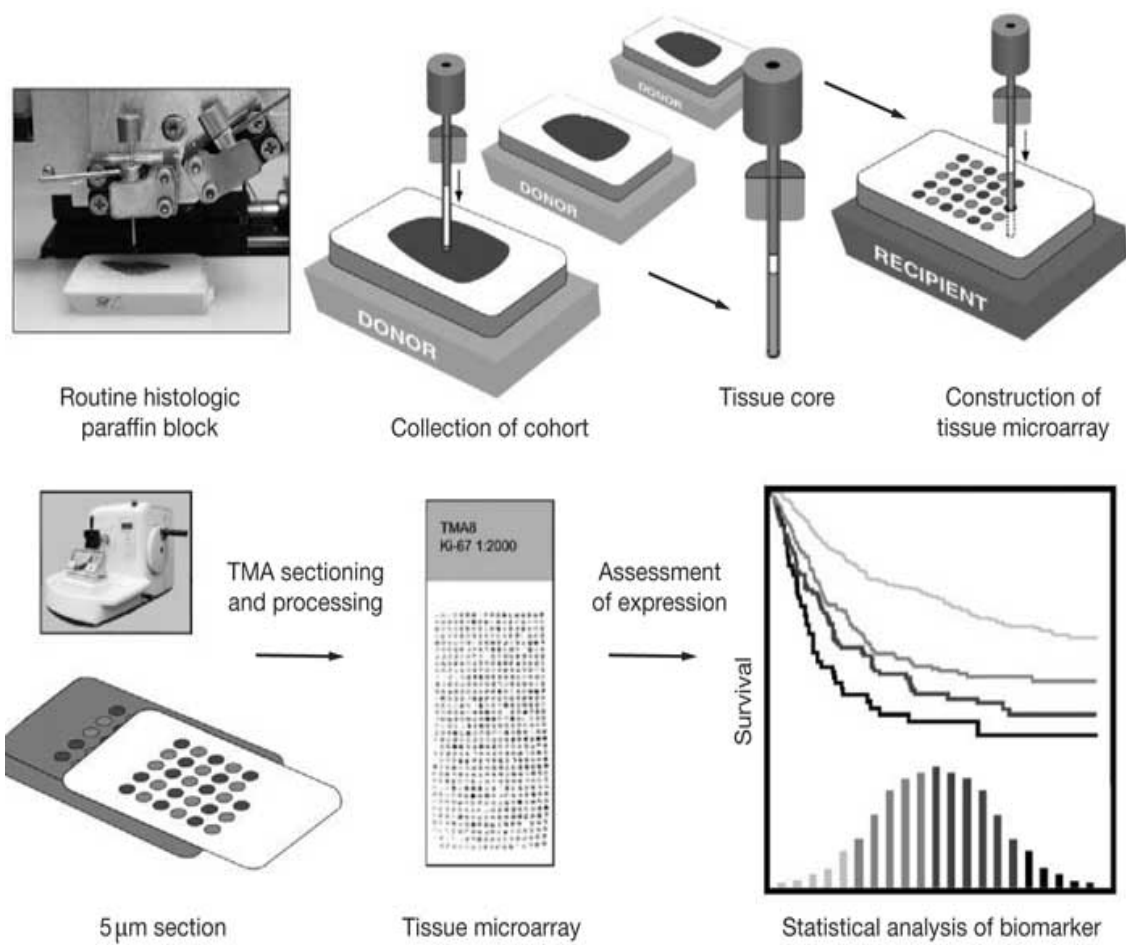
C.C
Orientador: Dr. Fernando Augusto Soares
Co-orientador: Dr. Francisco Ricardo Gualda Coelho

Anexo 2 - Carta de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto Brasileiro de Controle ao Câncer

Projeto de Pesquisa: “Análise dos padrões de expressão imunoistoquímica da ciclooxigenase-2 (COX-2), c-erb-2 e receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) em lesões precursoras de neoplasias e em carcinomas invasores do colo do útero” – Pesquisadora Principal Dra. Elza Mieko Fukazawa do Departamento de Ginecologia Oncológica do IBCC.

- Registro CEP Nº 098/2005/14 em 18/11/2005.
- Aprovado em reunião do CEP de 16/12/2005 com recomendação.
 - Relator: Dr. Paulo Iakowski Cyrillo.
 - Relatório Parcial em 29/06/2006

Anexo 3 - Construção do *tissue microarrays*



Fonte: GILTNANE e RIMM (2004).

Anexo 4 - ACIS III, especificações do produto



Specification	Dako ACIS® III Image Analysis System
Input Format	1 x 3 inch standard microscope slides
Objective Lens	Nikon 4X, 10X, 20X, 40X and 60X
Scanning Region	23 x 50 mm
Slide Loading	Automated, 100-slide loader maximum, using a 4-slide carrier
Tissue Finding	Automatic
Focus	Automatic
Network Interface	100/1000 Mbit/sec Ethernet
Dimensions	23" W x 18" H x 18" D (58 cm W x 46 cm H x 46 cm D)
Weight	125 lbs (57 kg)
Documentation	User's Manual
Warranty	12 months (parts & labor)
Service & Support	Included for 12 months
Regulatory Status	Class 2, CE-IVD
Software	
System Software	ACIS® version 3.0.1
Image Analysis Applications	Nuclear Application, Membrane Application and Rare Event Applications
Operating System	Microsoft Windows XP Professional
Additional Software	Microsoft Excel 2003
Additional Components	
Monitor	HP 23-inch Flat Panel Display
Report Printer	HP Color Printer
UPS	Uninterruptible Power Supply (110V or 220V)
Label Printer	Zebra Label Printer and label pack
Slide Scanning Speed	15 x 15mm, 10x objective (relative to 20V), 9 minutes

www.dako.com

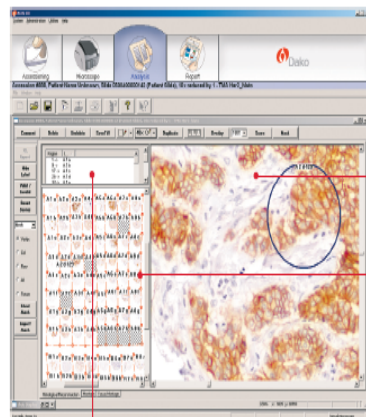
Distributors in more than 50 countries



For In Vitro Diagnostic Use.

Anexo 5 - ACIS III, análise do *Tissue Microarray*

ACIS® III Tissue Microarray Analysis



Steps to Consistent Results

Step 1 Image Acquisition ACIS® III uses a proprietary *Silhouette Scanning* technique to locate core samples on the slide. This feature saves time and creates smaller files by scanning only areas where sample is present. Captured images are assembled as a histological reconstruction with low- and high-magnification images presented to the user for further analysis.

Step 2 Sample Selection User-defined templates are created easily to accommodate virtually any specimen layout, then the ACIS® III automatically creates a flexible mesh around each specimen within the array. If desired, the user manually can adjust the mesh to account for missing, touching or partial specimens within the array.

Step 3 Image Analysis With the touch of a button, ACIS® III automatically quantifies staining intensity, percent positive and other parameters for each core specimen. Numerical scores are presented to the reviewer for confirmation or further analysis. User has the option to score an entire specimen core or define analysis sub-regions within a core.

Step 4 Sample Navigation Specimens within the array are labeled clearly to facilitate navigation between the resulting data, and low magnification or high-magnification images.

Step 5 Data Management Analysis data from the tissue microarray are exported seamlessly into standard spreadsheet or database formats to dramatically simplify statistical or comparative analysis.

	A	B	C	D	E
1	Label	Brown Area	Blue Area	Percentage	Average Brown Intensity
2	A a 0	319	13502	2.31	63
3	A b 0	5017	6018	45.47	67
4	A c 0	793	13238	5.66	77
5	A d 0	2086	10189	16.99	61
6	A e 0	1833	9992	15.50	91
7	B a 0	561	16199	3.35	64
8	B b 0	5998	8362	41.77	104
9	B c 0	11189	3232	77.58	115
10	B d 0	4481	833	84.32	74
11	B e 0	956	2258	29.75	66
12	A a 1	995	22392	4.25	67
13	A b 1	331	14126	2.29	59

www.dako.com

Distributors in more
than 50 countries