

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DAS
VIAS NOTCH, WNT E NF-KB EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE E LESÕES PRECURSORAS
DO COLO UTERINO**

RENATO ALMEIDA ROSA DE OLIVEIRA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

Co-Orientador: Dr. Levon Badiglian Filho

São Paulo

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Oliveira, Renato Almeida Rosa de

Análise imunoistoquímica das vias Notch, WNT e NF-KB em carcinoma epidermóide e lesões precursoras do colo uterino / Renato Almeida Rosa de Oliveira – São Paulo, 2014.

61p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. NEOPLASIAS DO COLO DO ÚTERO. 2. VIA DE SINALIZAÇÃO WNT. 3. RECEPTOR NOTCH1. 4. NF-KAPPA B. 5. IMUNOISTOQUÍMICA. 6. CARCINOMA EPIDERMÓIDE

DEDICATÓRIA

À minha querida esposa, Mariana, por todo o seu amor, dedicação e apoio incondicionais. Sua compreensão e paciência são fundamentais no entendimento de minha atribulada profissão. Sua participação e entusiasmo sempre foram determinantes, inclusive em meu crescimento profissional. À você, com muito amor.

Aos meus pais, Jorge e Oraide, que me ensinaram a importância do estudo, do trabalho e dos valores na formação do caráter. Por terem me guiado na construção dos meus sonhos, acreditando em meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, pela valiosa contribuição nesta obra. Agradeço a confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Gustavo Cardoso Guimarães, pela amizade, pelo apoio e pelos valiosos ensinamentos (entre eles o “*não sofra!!!*”) que guiaram minha formação médica, cirúrgica, oncológica e humana. Obrigado por ter depositado em mim a sua confiança.

À Dra. Elza Mieko Fukazawa, pela amizade e pelo incentivo ao me iniciar na carreira da pesquisa. Suas idéias balizaram esta obra e foram fundamentais para o meu crescimento na Oncologia Ginecológica.

À minha família, pelo amor, carinho e incentivo durante toda a minha formação acadêmica e profissional.

Aos meus amigos de trabalho, pelo apoio, companheirismo e incentivo na execução dessa obra e em minha formação em oncologia. Aos grandes amigos do Departamento de Ginecologia: Lillian Yuri Kumagai, Carlos Chaves Faloppa, Levon Badiglian Filho, Ademir Narcizo Menezes e Glauco Baiocchi Neto. Aos grandes amigos do Núcleo de Urologia do Departamento de Cirurgia Pélvica, do qual faço parte: Thiago Borges Marques Santana, Ricardo de Lima Favaretto, Wilson Bachega Jr., Stenio de Cássio Zequi, Rodrigo Sousa Madeira Campos, Carlos Alberto Ricceto Sacomani, Walter Henriques da Costa e Bruno dos Santos Benigno.

Aos membros da Comissão Julgadora desta Defesa de Mestrado: Dra Liliana Aparecida Lucci de Angelo Andrade, Dra Kátia Cândido Carvalho e Dr. Glauco Baiocchi Neto. Pelas sugestões e críticas construtivas que colaboraram com a versão final desta obra.

À Sra. Suely Francisco, pela revisão da diagramação e das referências bibliográficas.

A secretaria da pós-graduação, funcionários do SAME e equipe da biblioteca, pelo atendimento prestativo e eficiente.

À equipe do Laboratório de Patologia, em especial Carlos Nascimento, Severino da Silva e Suely Nonogawa. Agradeço a boa vontade, prontidão e eficiência no preparo das lâminas e reações imunoistoquímicas.

À Fundação Antônio Prudente/A.C.Camargo Cancer Center, a quem devo minha formação acadêmica, profissional e humana. Orgulho de pertencer a essa respeitosa casa.

RESUMO

Oliveira RAR. **Análise imunoistoquímica das vias notch, WNT e NF-KB em carcinoma epidermóide e lesões precursoras do colo uterino.** São Paulo; 2014. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O câncer do colo do útero é um importante problema de saúde em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento. A análise dos mecanismos das múltiplas etapas da carcinogênese do colo do útero propiciou melhor compreensão das vias de sinalização intracelulares alteradas na evolução das lesões intraepiteliais (LIEs) para o carcinoma invasivo. A interação das proteínas E6 e E7 do HPV de alto risco com vias de sinalização do NOTCH, NF-kB e WNT parece constituir uma importante via carcinogênica no colo do útero. Estudos recentes demonstram interação entre tais vias no desenvolvimento de neoplasias malignas de outros órgãos. No entanto poucos estudos analisaram conjuntamente a expressão dessas proteínas na transição das LIEs de baixo e alto grau (LIEBG e LIEAG) para o carcinoma invasor em amostras de tecido. Para analisar a expressão destas proteínas durante as etapas da progressão do carcinoma epidermóide do colo do útero, foram selecionadas amostras de 84 pacientes com diagnósticos de neoplasias intraepiteliais e carcinomas invasores do colo uterino, contendo 15 casos de LIEBG, 30 casos de LIEAG e 39 casos de carcinoma epidermóide (CEC) do arquivo de Anatomia Patológica do AC Camargo Cancer Center. Foram avaliadas, através da imunoistoquímica, as expressões das proteínas das vias NOTCH, WNT E NF-kB nas lesões intraepiteliais de baixo e alto grau e em carcinomas invasores do colo do útero estágio clínico I da FIGO, verificando suas relações com a sua evolução patológica sequencial. As expressões imunoistoquímicas das proteínas Notch 1 e NF-kB p105 se correlacionaram com a progressão das LIEs para o carcinoma invasor com $p < 0,0001$ e $0,005$ respectivamente. O presente estudo demonstra que essas vias intracelulares podem estar envolvidas na progressão do câncer de colo uterino.

SUMMARY

Oliveira RAR. **[Immunohistochemical analysis of Notch, WNT and NF-KB pathways in squamous cell carcinoma and precursor lesions of the cervix]**. São Paulo; 2014. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Cervical cancer is a major health problem worldwide, especially in developing countries. The analysis of the mechanisms of multistep carcinogenesis of cervical cancer provided better understanding of altered intracellular signaling pathways during the development of squamous intraepithelial lesions (IELs) to invasive carcinoma. The high-risk HPV proteins E6 and E7 interaction with NOTCH, NF - kB and WNT signaling appears to be an important carcinogenic pathway in cervical cancer. Recent studies have shown interaction between these pathways in development of malignant neoplasms of other organs. However, few studies analyzed the expression of these proteins together in the transition from low and high-grade (LSIL and HSIL) to invasive carcinoma in tissue samples. To analyze the expression of these proteins during the progression stages of squamous cell carcinoma of the cervix, samples from 84 patients were selected with diagnoses of intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the cervix, whereas 15 cases of LSIL, 30 cases of HSIL and 39 cases of squamous cell carcinoma (SCC) from the Pathology's Department files, in A.C.Camargo Cancer Center. The protein's expressions of NOTCH, WNT and NF - kB pathways were evaluated by immunohistochemical staining in LSIL, HSIL and FIGO's stage I invasive carcinoma of the cervix, correlating with the pathological sequential of progression. The immunohistochemical expression of Notch 1 and NF - kB p105 proteins correlated with the progression of IELs for invasive carcinoma with $p < 0.0001$ and 0.005 respectively. The present study demonstrates that these intracellular pathways may play a role in the progression of cervical cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014, por sexo.....	1
Figura 2	Microscopias das lesões precursoras e do carcinoma invasor do colo uterino.....	3
Figura 3	Representação esquemática da infecção causada pelo vírus HPV e suas alterações celulares.....	6
Figura 4	Representação esquemática da via Notch.....	8
Figura 5	Representação esquemática da interação entre a proteína viral E6 do HPV, a proteína p 53 e a via Notch.....	10
Figura 6	Representação esquemática da via NF-kB.....	12
Figura 7	Representação esquemática da via WNT.....	14
Figura 8	Delineamento do estudo.....	21
Figura 9	Representação gráfica das expressões imunoistoquímicas dos marcadores Notch1, NF-kB p105, Wnt5a e Beta catenina nas diferentes lesões cervicais	32
Figura 10	Representação fotográfica das expressões imunoistoquímicas dos marcadores Notch1, NF-kB p105, Wnt5a e Beta catenina nas diferentes lesões cervicais	33
Figura 11	Representação gráfica da correlação entre as expressões imunoistoquímicas positivas dos marcadores Notch1 e NF-kB p105, nas diferentes lesões cervicais	34

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Correspondência entre as classificações histopatológicas das lesões de colo uterino.....	2
Quadro 2	Relação dos anticorpos utilizados nas reações imunoistoquímicas das vias Notch, NF-kB e WNT.....	25
Tabela 1	Distribuição da casuística de acordo com variáveis demográficas e estilo de vida.....	29
Tabela 2	Distribuição da casuística de acordo com variáveis clínicas, anatomopatológicas e o tipo de tratamento.....	30
Tabela 3	Resultado das expressões imunoistoquímicas dos marcadores Notch1, NF-kB p105, Wnt5a e Beta catenina de acordo com as lesões cervicais.....	31
Tabela 4	Resultado das expressões imunoistoquímicas dos marcadores Notch1, NF-kB p105, Wnt5a e Beta catenina nos 39 casos de carcinoma espinocelular e seus dados anatomopatológicos.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Proteína Adenomatous poliposis coli
AXIN	Proteína AXIN
BSA	Albumina Bovina
CCDN1	Gene da Ciclina D1
CEC	Carcinoma espinocelular
c-MYC	Gene c-Myc
c-Rel	Gene Rel B
DAB	3,3 DiaminobenzidineTetrahydrochloride
DELTA LIKE 1 2,3	Ligantes da via Notch
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E6, E7	Genes de leitura precoce (early)
E6AP	Complexo protéico formado coma a proteína viral E6 do HPV
EGF	Receptor do fator de crescimento epitelial (inglês, epidermal growth factor)
EGFR	Fator de crescimento epitelial (inglês, epithelial growth fator)
F.A.S.	Prof. Dr. Fernando Augusto Soares (Médico Patologista)
FZD	Receptor Frizled da via WNT
GSK3	Proteína glycogen sinthase kinase
HPV	Human Papiloma Virus
HSIL	High-grade squamous intraepithelial lesions
ICN	Fração ativa do Notch (inglês, intracelular Notch)
IEL	Intraepithelial lesions
IkB	Proteína fator IkB da família NF-kB
IKK	Proteína fator IKK da família NF-kB
JAGGED 1 2	Ligantes da via Notch
K-RAS	Gene do K-RAS
LEF/TCF	Fator de transcrição
LIE	Lesão intraepitelial

LIEAG	Lesão intraepitelial de alto grau
LIEBG	Lesão intraepitelial de baixo grau
LRP 5/6	Receptor LRP 5/6 da via WNT
LSIL	Low-grade squamous intraepithelial lesions
MMP9	Metaloproteinase tipo 9
NaN₃	Azida sódica
NF-κB	Fator nuclear kappa B (inglês, Nuclear fator kappa B)
NF-κB1 (p50/p105)	Gene NF-κB1
NF-κB2 (p52/p100)	Gene NF-κB2
NIC I, II e III	Neoplasia intracervical graus I, II e III
NOTCH (1-4)	Genes Notch 1, 2, 3 e 4
p53	Proteína p53
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI3K-AKT	Via intracelular
pRb	Proteína do Retinoblastoma
PTEN	Gene do PTEN
Rel A (p65)	Gene Rel A
Rel B	Gene c-Rel
SCC	Squamous cell carcinoma
WNT	Gene WNT (inglês, junção: “wingless + integration)

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Infecção pelo HPV	4
1.2	Via do gene Notch.....	7
1.3	A via do NF-kB (Nuclear Facto kappa B)	11
1.4	A via do WNT.....	13
1.5	Interação entre Notch, NF-kB e WNT	15
2	OBJETIVOS.....	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	Seleção de amostra e Revisão anatomopatológica.....	20
3.2	Critérios de inclusão.....	22
3.3	Critérios de exclusão.....	22
3.4	Termo de consentimento informado	23
3.5	Comitê de Ética em Pesquisa.....	23
4	METODOLOGIA	24
4.1	Imunoistoquímica.....	24
4.2	Leitura de lâminas.....	26
4.3	Análise estatística.....	27
5	RESULTADOS	28
5.1	População do estudo.....	28
5.2	Expressão das proteínas Notch 1, NF-kB p105/50, Beta catenina e Wnt5a	30
6	DISCUSSÃO.....	37
6.1	Expressão da via Notch durante a progressão do câncer de colo uterino	39
6.2	Expressão da via NF-kB durante a progressão do câncer de colo uterino	41
6.3	Expressão da via WNT durante a progressão do câncer de colo uterino	43

7	CONCLUSÃO	50
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Ficha de coleta de dados I

Anexo 3 Ficha de coleta de dados II

Anexo 4 Estadiamento do câncer de colo uterino – FIGO 2009

1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é a segunda neoplasia mais comum entre mulheres no mundo, sendo responsável por cerca de 530 mil casos novos e pelo óbito de aproximadamente 275 mil mulheres ao ano (FERLAY et al. 2010). Cerca de 80% dos casos novos ocorrem em países em desenvolvimento devido principalmente à falta de programas de rastreamento adequados. O número de casos novos do câncer do colo do útero esperados para o Brasil no ano de 2014 é de 15.590, com um risco estimado de 15,33 casos a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2014).

Figura 1.

Localização primária	casos novos	%			Localização primária	casos novos	%
Próstata	68.800	22,8%			Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

Fonte: Ministério da Saúde (2014)

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014, por sexo, exceto pele não melanoma.

O carcinoma cervical origina-se de lesões pré-malignas que apresentam alterações citoarquiteturais restritas ao epitélio de revestimento do colo do útero, sem invasão do estroma cervical. As principais características destas lesões são a imaturidade, a desorganização celular, as anormalidades nucleares e o aumento da atividade mitótica. Em 1961, a Organização Mundial da Saúde-OMS classificou essas lesões em displasias leve, moderada, acentuada e carcinoma *in situ*. Segundo classificação proposta por Richard em 1967, quando essas alterações ocorrem apenas no terço inferior do epitélio a lesão geralmente é designada de NIC I (neoplasia intra epitelial grau 1). O envolvimento dos terços médio e superior do epitélio é diagnosticado como NIC II e NIC III (neoplasia intra epitelial graus 2 e 3) respectivamente. (WRIGHT et al. 2002).

Em 1988 o Sistema de Bethesda foi introduzido para a classificação diagnóstica citológica das alterações do trato genital inferior, sendo revisado nos anos de 1991 e 2001 (SOLOMON et al. 2002; APGAR et al. 2003).

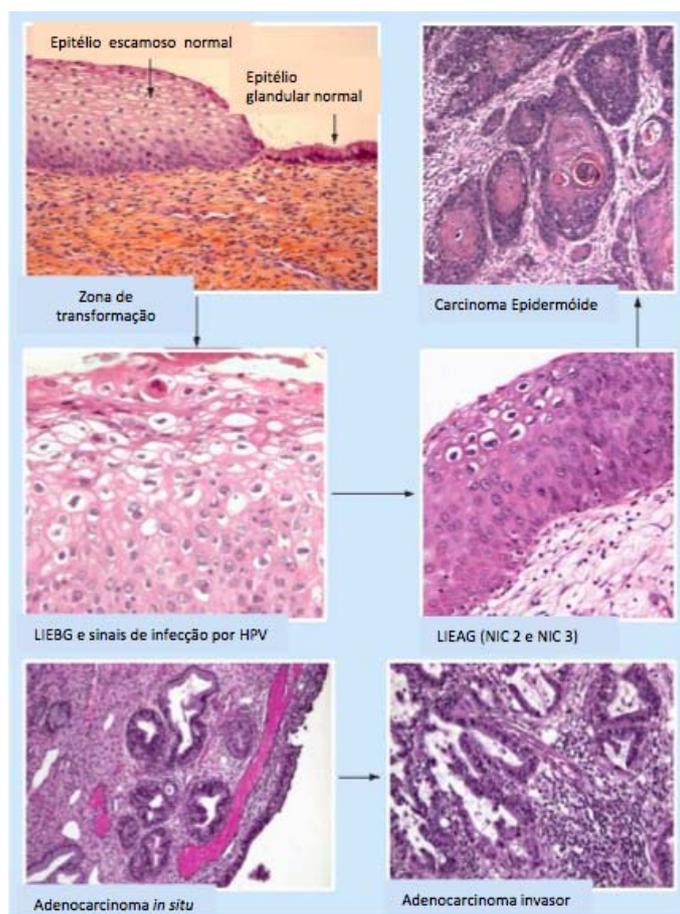
Atualmente se utiliza a classificação pelo Sistema de Bethesda (1988-2001), onde a classificação citológica das lesões precursoras do câncer de colo uterino são divididas em Lesão intra-epitelial de baixo grau (LIEBG) e Lesão intra-epitelial de alto grau (LIEAG). **Quadro 1**

Quadro 1 – Correspondência entre as classificações citológicas

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

Fonte: WRIGHT et al. (2002)

Em revisão na literatura sobre a história natural da NIC durante os últimos 40 anos, OSTOR (1993) relata que a frequência média de progressão de NIC I para carcinoma *in situ* (NIC III) é de 11% e de NIC II para carcinoma *in situ* é de 22. A progressão para doença invasiva foi de 1% para a NIC I, de 5 % para a NIC II e mais de 12 % para a NIC III (PALO et al. 2002).



Fonte: Adaptado de WOODMAN et al. (2007)

Figura 2 - Microscopias das lesões precursoras e do carcinoma invasor do colo uterino

A integração dos dados oriundos dos laboratórios de pesquisa básica com aqueles extraídos dos estudos epidemiológicos e clínicos têm imputado ao vírus Papiloma Humano (do inglês, Human papillomavirus - HPV) o papel principal na carcinogênese das neoplasias epiteliais primárias do colo uterino (DOORBAR 2005; WOODMAN et al. 2007; PLASENCIA et al. 2008).

1.1 INFECÇÃO PELO HPV

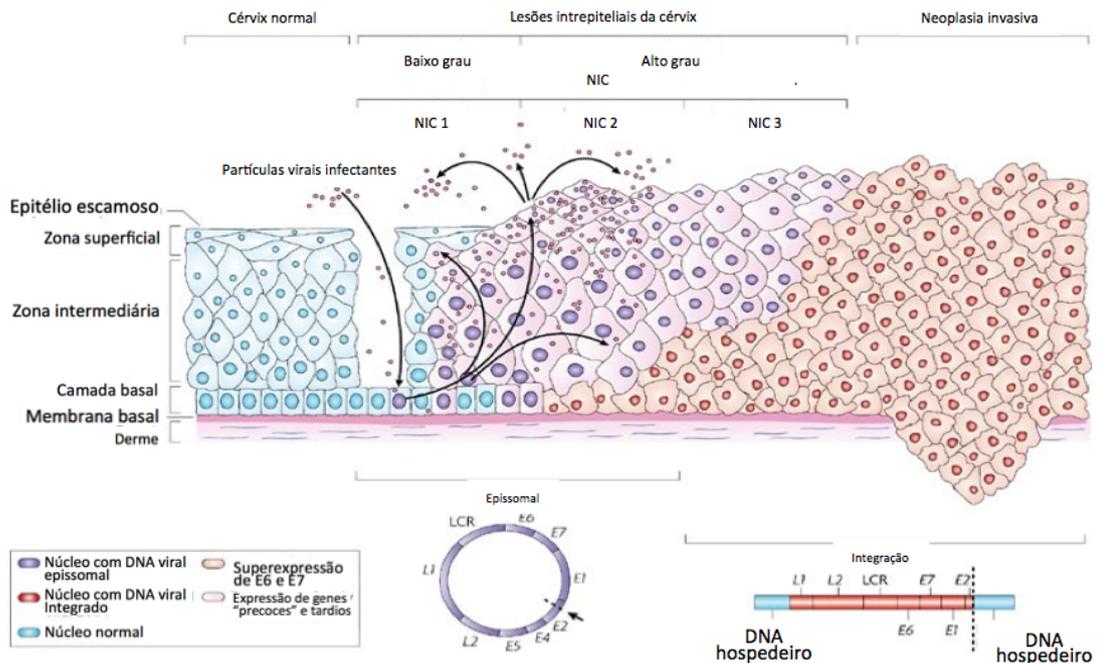
Estudos sobre o vírus HPV já identificaram mais de 200 subtipos do vírus, sendo que 40 deles podem causar infecção do trato genital inferior. Esses vírus são classificados em dois grupos (Baixo Risco e Alto Risco) em relação ao seu potencial oncogênico. No grupo de baixo risco encontram-se mais comumente os tipos 6 e 11, que estão relacionados com o desenvolvimento de lesões de baixo potencial de malignidade, como as verrugas genitais. No grupo de alto risco encontram-se os tipos 16 e 18, com alto potencial oncogênico. Virtualmente todos os casos de câncer de colo uterino estão relacionados a presença de material genético do DNA de vírus desse grupo, sendo mais frequentemente encontrado o tipo 16, seguidos dos tipos 18, 31, 33 e 45. No câncer de colo uterino pode-se identificar a infecção pelos tipos 16 e 18 em cerca de 70% dos casos, e nas verrugas genitais os tipos 6 e 11 em cerca de 90% (SOUTHERN e HERRINGTON 1998; LONGWORTH e LAIMONIS 2004; VILLA 2006; BOCCARDO e VILLA 2007; BOULET et al. 2007; WOODMAN et al. 2007).

O desenvolvimento do câncer de colo uterino está relacionado a uma série de fatores de risco, sendo o principal deles a infecção persistente com HPVs de alto

risco (STANLEY 2001; DOORBAR 2005; SNIJDERS et al. 2006; BOCCARDO e VILLA 2007; PLASENCIA et al. 2008).

Após a infecção ocorre a desregulação no ciclo de vida do vírus HPV. Durante o desenvolvimento de lesões precursoras de baixo grau (LIEBG) o genoma viral mantém-se em sua forma episomal. Com a evolução, surgem importantes alterações em sua expressão gênica encontradas na transformação para as lesões de alto grau (LIEAG). Ocorre então a integração do material genético viral ao material cromossômico do hospedeiro. Durante este evento, quantidades crescentes das proteínas virais E6 e E7 são detectadas. Tais proteínas desempenham papel crucial no desenvolvimento das neoplasias malignas, pois interagem com a proteína supressora de tumor (p53) e proteína do retinoblastoma (pRB) causando sua degradação e conseqüentemente alterações no ciclo celular e na apoptose (DOORBAR 2006; VILLA 2006; BOCCARDO e VILLA 2007; BOULET et al. 2007; WOODMAN et al. 2007; PLASENCIA et al. 2008).

Ocorrem então perdas dos mecanismos de reparo do DNA do hospedeiro durante o final da “fase S” do ciclo celular, que culminarão no acúmulo de mutações genéticas e conseqüentemente no aparecimento das lesões malignas do colo uterino (SOUTHERN e HERRINGTON 1998; STANLEY 2001; DOORBAR 2006; VILLA 2006; SNIJDERS et al. 2006). **Figura 3**



Fonte: Adaptado de WOODMAN et al. (2007)

Figura 3 - Representação esquemática da infecção causada pelo vírus HPV e suas alterações celulares.

Apesar do papel central desempenhado pela infecção causada pelo vírus HPV, a progressão de doença ocorrida entre as LIE e o carcinoma invasivo é pouco frequente. A maioria das lesões precursoras apresentam regressão espontânea, fato que está intimamente relacionado à imunidade do hospedeiro.

Um longo tempo de exposição ao vírus HPV associado a co-fatores (como o tabagismo, hábitos sexuais, uso de hormônios) se faz necessário para o surgimento do câncer do colo uterino (SNIJDERS et al. 2006; DOORBAR 2006; WOODMAN et al. 2007; PLASENCIA et al. 2008).

Diversos estudos *in vitro* demonstraram relação entre o desenvolvimento da doença com a expressão de marcadores moleculares das vias intracelulares do **Notch**, **NFκB** e **WNT**. Tais vias moleculares exibem alterações em seu funcionamento na presença dos genes *E6* e *E7* do HPV, e podem culminar na transcrição de genes alvos

responsáveis pela regulação do ciclo celular, crescimento e apoptose (UREN et al. 2005; LICHTIG et al. 2009; KATOH e KATOH 2009a e b).

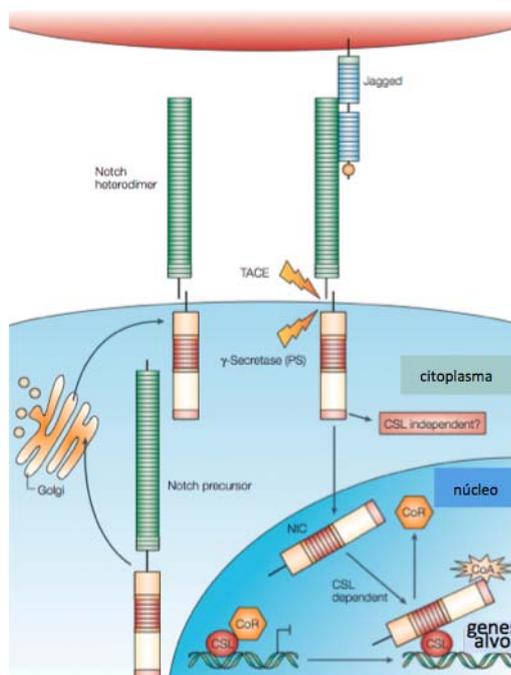
As vias do Notch, Wnt e NFkB também estão implicadas na carcinogênese de outros tipos de neoplasias, como câncer de boca, colorretal, ovário e pele. Poucos estudos realizaram avaliação concomitante de tais vias moleculares no câncer de colo uterino, sendo ainda mais raros os experimentos que demonstraram a sua correlação (RAMPIAS et al. 2010; HUANG et al. 2008; BADIGLIAN FILHO et al. 2009; KATOH e KATOH 2007).

1.2 VIA DO GENE *NOTCH*

A via do gene *Notch* é responsável pela diferenciação e desenvolvimento celulares durante as vidas embrionária e pós natal, e parece desempenhar um papel crítico no equilíbrio entre proliferação, diferenciação e apoptose celular. Tais atividades podem ser observadas durante o processo de renovação celular. Esta via também está envolvida na oncogênese, sendo que seu papel de promotor ou de inibidor tumoral ainda não foi estabelecido na literatura (RADTKE e RAJ 2003).

O *Notch* é um gene que codifica uma família de quatro tipos de proteínas transmembrana (Notch 1-4), as quais possuem um domínio extracelular com receptores EGF – like (*epidermal growth factor*), cinco ligantes (Delta like 1, 3, 4 e *Jagged* 1 e 2) e uma porção ativa intracelular chamada Notch-IC (ICN). Esta fração ativa pode ser liberada do receptor quando este recebe estímulos de pelo menos duas outras células vizinhas. BRAY (2006) A fração ativa Notch IC migra para o núcleo da célula, liga-se a determinados fatores nucleares e ativa a transcrição de

determinados genes alvos como o da *Ciclina D1* (*CCND1*) e *MYC* (RADTKE e RAJ 2003; KOVALL 2008). **Figura 4**



Fonte: RADTKE e RAJ (2003)

Figura 4 - Representação esquemática da via Notch.

Mutações no gene *Notch* foram inicialmente identificadas em pacientes portadores de leucemia, onde a clivagem do *Notch1* e a consequente ativação de sua via de sinalização levavam a transformação maligna em linfócitos T (WENG et al. 2004).

Em neoplasias sólidas, poucos são os estudos que abordam a mutação do gene *Notch*, bem como as alterações da sua via. Tais alterações parecem ser eventos iniciais na formação de tumores do sistema nervoso central (HULLEMAN et al. 2009), próstata (SHOU et al. 2001; WHELAN et al. 2009), mama (NAM et al. 2008; HARRISON et al. 2010; CHEN et al. 2010), cólon (RODILLA et al. 2009; FRE et al. 2009), pâncreas (DE LA et al 2008; MULLENDRE et al. 2009) e no colo

uterino (THORLAND et al. 2003; VEERARAGHAVALU et al. 2004; RAMDASS et al. 2007; SONG et al. 2008).

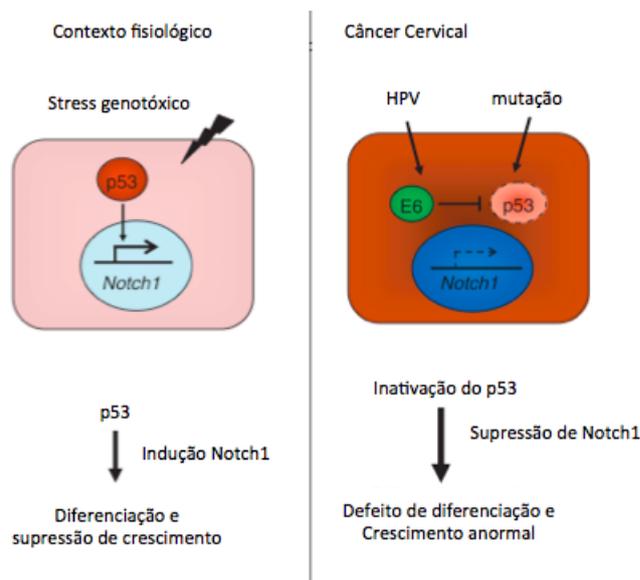
Os resultados sobre o exato papel dessa via são antagônicos, sendo demonstrado que o Notch pode exercer tanto a função de um **oncogene** quanto a função de **supressor tumoral**, dependendo do contexto no qual está inserido. Além do Notch 1, estudos in vitro demonstram que as proteínas Notch 2, 3 e 4 podem exibir expressão aumentada, nuclear ou citoplasmática, em lesões avançadas, o que pode denotar também um papel de promotor tumoral da via (YEASMIN et al. 2010).

Os principais fatores contextuais implicados são o microambiente celular, a interação com outras diferentes vias de sinalização, o estágio da tumorigênese e obviamente os diferentes tipos de neoplasias (RANGANATHAN et al. 2011). Como exemplo, no câncer de pâncreas, a ativação da via Notch desempenha papel supressor tumoral nos eventos iniciais da tumorigênese. Em contrapartida, durante estágios mais avançados de transformação desta neoplasia, a ativação da via do Notch desempenha função oncogênica (PLENTZ et al. 2009; HANLON et al. 2010).

A via *Notch* promove controle e equilíbrio entre proliferação, apoptose e diferenciação celulares. Em relação a proliferação celular, diversas interações com outras vias de sinalização são descritas, como a via RAS, em células epiteliais de mama (MITTAL et al. 2009) e a via do PI3K – AKT, com ativação das vias dos genes *K-RAS*, *CCDN1* e *MMP9* nos gliomas (XU et al. 2010). Outro exemplo é o câncer de próstata, onde a interação da via Notch com Receptores de Tirosina – Kinase, (como o EGFR) e com o gene supressor tumoral *PTEN* foi descrita por SHOU et al. (2001) e WHELAN et al. (2009), apresentando, em última instância, efeito supressor tumoral.

A apoptose, importante mecanismo de controle da população celular, pode ser inibida pela ação do *Notch* através da regulação negativa dos genes *p53* e *PTEN*. A inibição desses genes pode ocorrer tanto pela ativação quanto pela supressão da via Notch, fato também dependente do contexto celular (NAIR et al. 2003; MUNGAMURI et al. 2006; LEFORT et al. 2007; WANG et al. 2009).

Durante a infecção pelo HPV, a proteína viral E6 se liga a outra proteína ubiquitinada, a E6AP, formando um complexo com a proteína do gene *p53*, causando sua inativação. Esta inativação leva a supressão do gene *Notch1*, comprometendo sua função de supressor tumoral (**Figura 5**). A fração ativa citoplasmática da via Notch, a ICN, deixa de migrar para o núcleo, ocorrendo desequilíbrio na expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular. Tal fato acarretará em defeitos na diferenciação celular e crescimento celular anormal (NARISAWA-SAITO e KIYONO 2007).



Fonte: Adaptado de NARISAWA-SAITO e KIYONO (2007)

Figura 5 - Representação esquemática da interação entre a proteína viral E6 do HPV, a proteína p 53 e a via Notch.

Embora pouco frequentes, alguns estudos descreveram a expressão do Notch e seus marcadores “*in vivo*” no câncer de colo uterino. Nos tecidos cervicais normais, bem como nas lesões precursoras (lesões intra epiteliais - LIE) e em tumores iniciais, a expressão do *Notch* mostrou-se gradativamente menor (especialmente a fração Notch1), sendo praticamente ausente nos tumores avançados. A expressão de Notch1 parece se correlacionar de forma inversamente proporcional à quantidade de expressão da proteínas E6 e E7 nas células infectadas pelo HPV. O aumento da expressão do Notch 1 se correlacionou com aumento da expressão de p53 e diminuição da hiperfosforilação do pRb, em keratinócitos primários. Dessa forma, o papel supressor tumoral da via Notch foi sugerido no câncer de colo uterino (TALORA et al. 2002; SUN et al. 2007; WANG et al. 2007).

1.3 A VIA DO NF-KB (*Nuclear Factor kappa-B*)

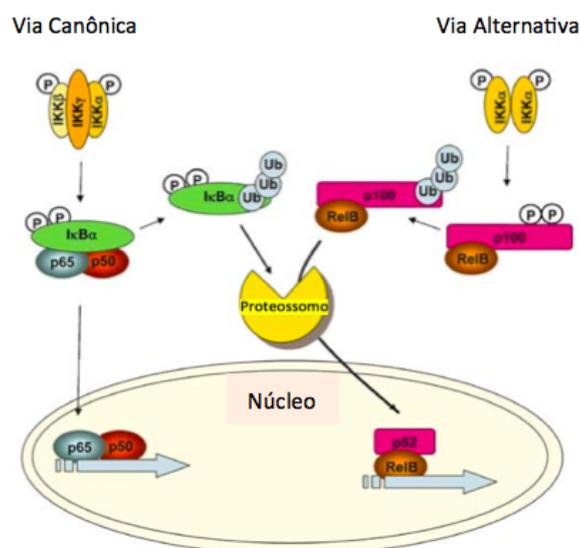
A via do *Fator Nuclear Kappa – B*, também designado NF-kB, consiste em uma família de fatores de transcrição que regulam genes responsáveis pelo desenvolvimento e progressão do câncer, proliferação celular, migração e apoptose. Compreendem cinco genes: *NFkB1* (*p50/p105*), *NF-κB2* (*p52/p100*), *RelA* (*p65*), *c-Rel* e *RelB*. As proteínas desta via têm sua concentração predominantemente citoplasmática, onde permanecem ligados ao fator IκB, o qual regula a transcrição (RAMDASS 2007; BAIOCCHI 2012).

Esta via pode ser ativada pela ação de proteínas citoplasmáticas, como a PI3K ou por infecções virais como a do HPV, sendo mediada por citocinas, fatores de crescimento e tirosina-quinases. A ativação da via do NF-kB leva à degradação do

fator I κ B pelo fator IKK, liberando as proteínas no citoplasma. Ocorre então a migração de tais proteínas para o núcleo celular onde agirão como fatores de transcrição de genes que codificam fatores anti-apoptóticos. A concentração aumentada desses fatores no núcleo e no citoplasma de células infectadas pela proteínas E6 e E7 do HPV já foi demonstrada na literatura (HAVARD et al. 2005; JAMES et al. 2006). **Figura 6**

A ativação desta via induz a produção de ciclinas, c-myc, COX2 e VEGF. Além de promover o desequilíbrio nos mecanismos de crescimento e proliferação celular, a via do NF- κ B também está relacionada com a quimio e radiorressistência (RADTKE e RAJ 2003; YAO et al. 2007).

A progressão de lesões intraepiteliais para a neoplasia invasora do colo uterino está relacionada à ativação da via do NF- κ B. Em relação aos tumores invasivos, a ativação desta via também está relacionada ao processo da perda de diferenciação celular, progressão tumoral e piora no prognóstico da doença (LI et al. 2009).



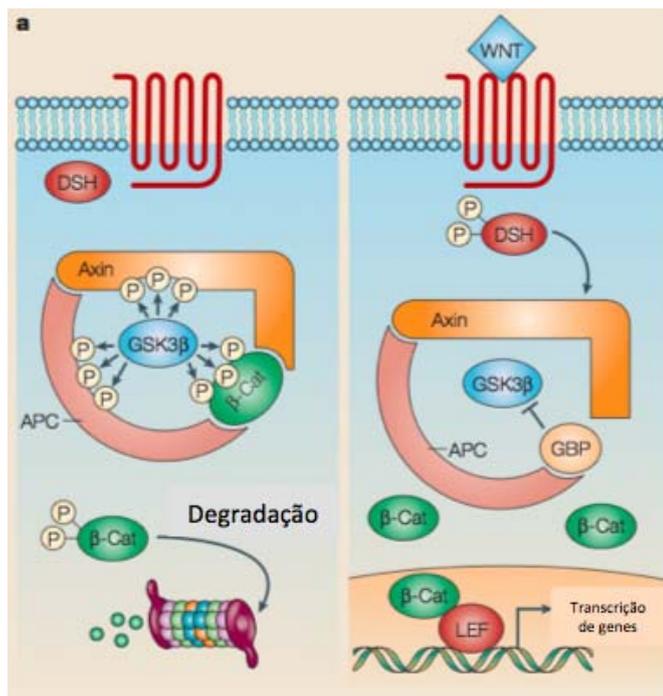
Fonte: Adaptado de DOLCET et al. (2005)

Figura 6 – Representação esquemática da via NF- κ B.

1.4 A VIA WNT

A via WNT também está relacionada ao desenvolvimento e diferenciação celular tanto na embriogênese quanto na oncogênese (quando ativada de forma aberrante). Seu papel na tumorigênese do câncer colorretal, tumores hepatocelulares, melanoma, carcinoma de cavidade oral, neoplasia maligna epitelial de ovário, condrossarcomas de extremidades e outros tumores já foram descritos em diversos estudos (POLAKIS 2000; DUAN et al. 2006; BADIGLIAN FILHO et al. 2009; GUIMARÃES et al. 2010).

O WNT compreende uma família de genes/proteínas envolvidas na embriogênese, diferenciação celular e oncogênese, o quais agem na célula através de quatro vias celulares, sendo a via canônica a mais discutida no processo de tumorigênese. Um complexo protéico intracelular formado pelo APC (*adenomatous polyposis coli*), GSK3 (*glycogen synthase kinase*) e o Axin, asseguram a degradação intracitoplasmática da beta-catenina, regulando sua concentração. A ativação da via WNT através dos receptores Frizled (FZD) e LRP 5/6, inativam a proteína GSK3beta, degradando o complexo protéico. A liberação da Axin diminui a fosforilação da beta-catenina, a qual aumenta sua concentração citoplasmática e migra para o núcleo da célula, onde se liga com o complexo LEF/TCF, induzindo a transcrição dos genes alvos *c-myc*, *cilcina D*, *VEGF* e outros (BADIGLIAN FILHO et al. 2009). **Figura 7**



Fonte: Adaptado de RADTKE e RAJ (2003)

Figura 7 – Representação esquemática da via WNT.

Outras formas de ativação da via WNT são menos estudadas, mas podem ser encontradas nas diferentes neoplasias. Como exemplo, a ativação constitutiva da beta-catenina pode ocorrer devido a mutações nos genes APC ou no AXIN (KORINEK et al. 1997; BIENZ e CLEVERS 2000).

Alterações na expressão dos ligantes do WNT também são implicadas na ativação da via. Tanto o silenciamento de genes que expressam ligantes inibitórios (CALDWELL et al. 2004; SUZUKI et al. 2004) quanto a superexpressão de outros ligantes estimuladores já foram implicados em tal processo (KIRIKOSHI et al. 2001; TERASAKI et al. 2002; OKINO et al. 2003; KATO e KATO 2007).

A mutação do próprio receptor LRP 5 também foi descrita por BJÖRKLUND et al. (2007) como fator de ativação da via WNT.

O aumento da concentração de beta-catenina em células de orofaringe infectadas pelo HPV 16 foi evidenciado no estudo de RAMPIAS et al. (2010), sendo encontrada forte concentração nuclear. De maneira semelhante, UREN et al. (2005) descreveu aumento nas concentrações de beta-catenina em estudo in vitro com células imortalizados pelo HPV. Estes achados sugerem ativação da via Wnt em células infectadas, sendo esta via um segundo passo (“*second hit*”) na progressão do câncer de colo uterino.

A ativação da via WNT / beta-catenina foi descrita no câncer de colo uterino como etapa adicional à infecção pelo HPV após análise da expressão intracelular de seus cofatores e ligantes, bem como a expressão de alterações genéticas associadas. (PLASENCIA et al. 2008).

1.5 INTERAÇÃO ENTRE NOTCH, WNT e NFκB

O ambiente intracelular é composto por redes de sinalizações multidimensionais com múltiplas conexões, interagindo através de “alças” de retroalimentação positiva ou negativa (“feedback”). Os componentes de cada rede de sinalização operam em diferentes escalas, temporal e espacialmente, com contínuas mudanças em resposta a interações célula-célula e célula-estroma. Esta complexa rede de sinalização coletivamente afeta a função e o comportamento celular (ZHANG et al. 2002).

KATOH e KATOH (2007) descreveram a existência da conexão entre as vias de sinalização do Wnt e Notch durante a carcinogênese do câncer gástrico e

sua interação, que pode amplificar os sinais oncogênicos levando a progressão da doença.

Segundo KATOH e KATOH (2009a e b), o NFkB pode estimular indiretamente a ativação via WNT, levando a superexpressão dos genes *WNT5A* e *WNT2B*, sendo o primeiro relacionado a invasão e metástases e o segundo relacionado a diferenciação celular e carcinogênese. Em contrapartida, a via WNT pode ser inibida pela estimulação da via Notch. A expressão de tais proteínas foi descrita inicialmente para tumores de esôfago, estômago, pâncreas, pele e outros.

NAKAMURA et al. (2007) descreveu a relação entre a via do Notch e WNT, demonstrando uma desregulação do equilíbrio entre a proliferação e a diferenciação das células progenitoras mantendo-as num estado indiferenciado durante o processo de tumorigênese.

A interação do Notch e da via WNT também foi descrita em experimento com camundongos portadores de mutação do gene *APC*, onde o bloqueio da via Notch resultou em células mais diferenciadas (VAN ES et al. 2005). Outro estudo mostrou a interação da beta-catenina com o ICN, levando ao aumento da transcrição de genes alvos (JIN et al. 2009).

Outro estudo experimental em camundongos também demonstrou a relação entre as duas vias, onde a deleção do *Notch* resultou em ativação da beta-catenina e formação de tumores de pele (NICOLAS et al. 2003).

A associação entre a via Notch e NFkB foi descrita no câncer do colo uterino em uma série de estudos (RAMDASS et al. 2007; SONG et al. 2008; OSIPO et al. 2008). A ativação do Notch age como regulador inicial das proteínas

IKK e I κ B, induzindo embargo do ciclo celular e apoptose (YAO et al. 2007; RAMDASS et al. 2007).

Postula-se que a alteração da via Notch seja o evento inicial da cascata da carcinogênese do câncer de colo uterino, envolvendo conseqüentemente as vias Wnt e NF κ B (RAMDASS et al. 2007; MALIEKAL et al. 2008; SONG et al. 2008; KATO e KATO 2009a e b).

Apesar das evidências apontadas pela literatura, a interação entre as vias de sinalização permanece não esclarecida. Estas complexas relações das vias sinalizadoras estão implicadas na embriogênese, homeostase e em especial na carcinogênese, quando seu equilíbrio é desregulado (RANGANATHAN et al. 2011).

Além dos efeitos descritos acima a ativação das vias de sinalização do Notch, Wnt e NF κ B são críticos para o processo de invasão e metástase pois, orquestram processos fundamentais durante a carcinogênese, como a angiogênese, (HELLSTRÖM et al. 2007; SUCHTING et al. 2007) a presença de células tronco tumorais (VARNUM-FINEY et al. 2000; PISTTOLATO 2010) e a transição epitélio mesenquimal – EMT (CHEN et al. 2010). Neste processo as células epiteliais adquirem propriedades mesenquimais como a redução da adesão celular e o aumento da motilidade celular, permitindo a célula tumoral migrar do sítio primário do tumor para invadir tecidos adjacentes (THIERY e SLEEMAN 2006; MIMEAULT e BATRA 2007; DE WEVER et al. 2008; ZHAU et al. 2008; KATO e KATO 2009a e b; TIMMERMAN et al. 2009).

Portanto, a nossa hipótese é de que durante a carcinogênese do colo do útero iniciada pelo HPV, as oncoproteínas E6 e E7 interajam com as vias de

sinalização do Notch, NFkB e Wnt, formando uma complexa via oncogênica que é crítica no processo de invasão e posteriormente metástase.

A maior parte dos estudos que relacionam as alterações dessas vias ao câncer de colo uterino referem-se a atividades *in vitro*. Poucos são os estudos realizados em produtos de peças operatórias, tanto em tumores invasores quanto em suas lesões precursoras (BRANCA et al. 2006; NARISAWA-SAITO e KIYONO 2007; RAMDASS et al. 2007).

Estes trabalhos demonstram que o modelo de carcinogênese *in vitro* induzida pelo HPV de alto risco, envolve as vias de sinalização do Notch, Wnt e NFkB, motivo deste estudo.

2 OBJETIVOS

- Avaliar, através da imunoistoquímica a expressão de proteínas das vias Notch, NFkB e Wnt nas neoplasias intraepiteliais de baixo e alto graus, e carcinomas epidermóides invasores do colo do útero estágio clínico I – FIGO.
- Correlacionar os níveis de expressão destas proteínas e sua associação com as diferentes lesões intraepiteliais e o carcinoma invasor do colo uterino.
- Correlacionar a expressão destas proteínas com as variáveis anatomopatológicas no carcinoma invasor (como grau histológico, invasão linfovascular, embolização linfática, embolização vascular e comprometimento linfonodal).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DE AMOSTRAS E REVISÃO ANATOMOPATOLÓGICA

Para o estudo da imunorreação de proteínas das vias Notch, NFkB e Wnt durante a transição de lesões intraepiteliais para o carcinoma invasor, foram selecionadas amostras de tecido fixado em formalina e embebido em parafina, de um grupo de 100 casos disponíveis de pacientes, sendo 20 casos de Lesões intraepiteliais de baixo grau (LIEBG - NIC I), 40 casos de Lesões intraepiteliais de alto grau (LIEAG – NIC II e NIC III) e 40 casos de carcinoma espinocelular de colo uterino. Todas as pacientes foram previamente submetidas a biópsias do colo uterino para indicação de seu tratamento cirúrgico.

Os casos foram coletados retrospectivamente por meio de consulta ao arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center.

Estas amostras são referentes a pacientes submetidas à histerectomia ou conização no período de 1991 a 2009 no Departamento de Ginecologia desta instituição.

Os blocos de parafina resgatados dos arquivos foram submetidos a novos cortes e corados com hematoxilina e eosina (HE). Todas as lâminas foram revisadas por único patologista do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center (FAS), para confirmar o diagnóstico.

Foram analisados os prontuários clínicos das 100 pacientes, sendo que 16 pacientes não preencheram os critérios de inclusão, devido a inadequação do material fixado para realização de imunoistoquímica. Um total de 84 pacientes foram incluídas no estudo conforme demonstrado esquematicamente na **Figura 8**.

No exame histológico, as lesões intraepiteliais foram graduadas e categorizadas de acordo com os critérios da Bethesda (2001) em Lesão intraepitelial de baixo grau (LIEBG) e Lesão intraepitelial de alto grau (LIEAG). O diagnóstico histológico de carcinoma espidermóide foi confirmado em todos os casos de carcinoma invasor, sendo incluídos somente casos com estadiamento clínico I, de acordo com os critérios da FIGO 2009. (**Anexo 4**)

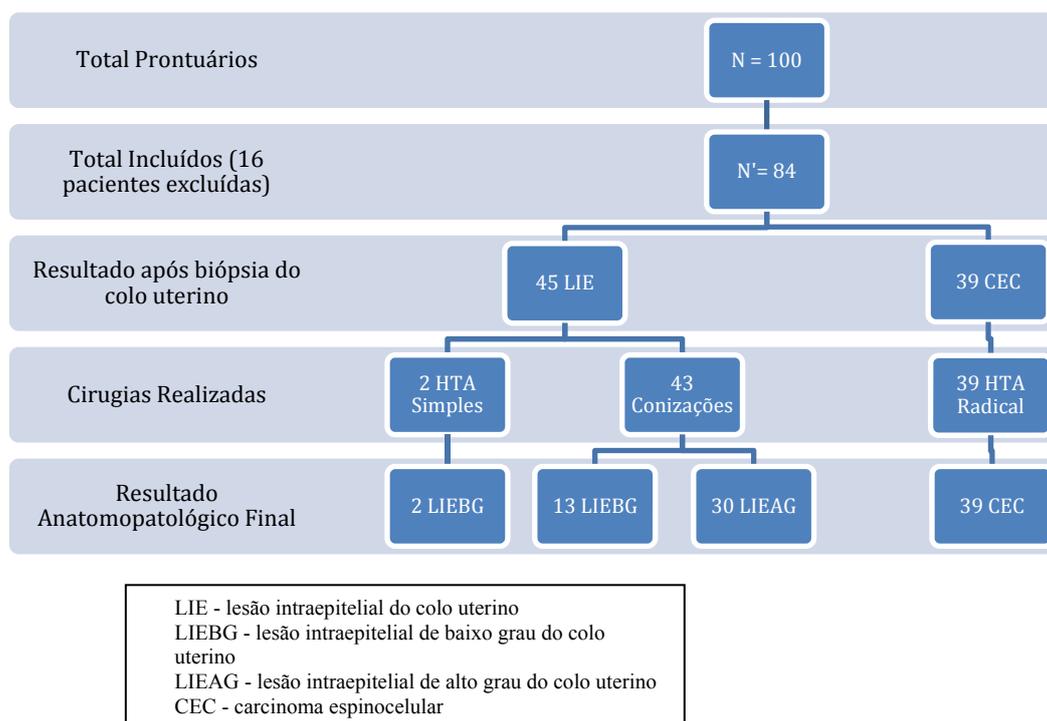


Figura 8 - Delineamento do estudo

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes submetidas à histerectomia ou conização no período de 1991 a 2009 no Departamento de Ginecologia do A.C.Camargo Cancer Center
- Pacientes com diagnóstico histológico de Lesões intraepiteliais de baixo ou alto grau do colo uterino em espécimes cirúrgicos de conização ou histerectomia simples.
- Pacientes com diagnóstico histológico de neoplasia invasiva de células escamosas em peças de histerectomia, diagnosticadas clinicamente como estadio I pelos critérios da FIGO 2009.

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Ausência de material suficiente para o estudo imunoistoquímico;
- Outras variáveis histológicas como adenocarcinomas, tumores neuroendócrinos e tipos histológicos não-epiteliais como as neoplasias mesenquimais;
- Histórico de tratamento prévio com Radioterapia pélvica,
- Histórico de quimioterapia prévia ao tratamento do câncer do colo do útero.

3.4 TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Não foi necessário o emprego de termo de consentimento informado, pois o estudo foi realizado retrospectivamente a partir de casos selecionados obtidos através dos arquivos da anatomia patológica.

3.5 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente no dia 29 de outubro de 2010.

4 METODOLOGIA

4.1 IMUNOISTOQUÍMICA

Foi realizado estudo imunoistoquímico para marcadores das vias Notch (Notch1), NFkB (NFkB p105-50) e WNT (WNT5a e beta-catenina). Foram avaliadas as expressões citoplasmáticas e nucleares dos marcadores utilizando-se cortes convencionais.

Todas as reações foram submetidas a controles positivos através da utilização de tecidos sabidamente reagentes para o antígeno pesquisado. Os controles negativos foram incluídos através da retirada do anticorpo primário e substituição por imunoglobulina não-imune para o antígeno em questão.

As reações foram realizadas seguindo o seguinte protocolo:

Desparafinização do cortes de 3 μm de espessura, do material incluído em parafina e deixado por 24 horas em estufa a 60 °C (xilol a 60C durante 20 minutos, xilol a temperatura ambiente durante 20 minutos, etanol 100% durante 30 segundos, etanol 85% durante 30 segundos, etanol 70% durante 30 segundos). A seguir as laminas foram lavadas em água corrente e água destilada. Após ferver a solução tampão citrato 10mM pH 6.0 em panela de pressão (Solar, Rapid Express, Tramontina) as lâminas foram mergulhadas na solução em ebulição e a panela foi lacrada com a válvula seletora de pressão no número 2. Após pressurização total por 3 minutos, a válvula seletora foi girada para liberação de vapor e a panela foi mantida fechada sob água corrente até a despressurização total. Então, após

destampar a panela as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada. A seguir, procedeu-se o bloqueio de peroxidase endógena com H₂O₂ 3% (água oxigena 10 vol.) com 4 trocas de 5 minutos cada. As lâminas foram então lavadas em água corrente e água destilada e novamente lavadas em solução salina tamponada com fosfatos (PBS – phosphate buffered saline) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido, conforme quadro abaixo, em tampão PBS, contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN₃) 0,1% por 30 minutos a 37 °C e por 18 horas, a 4 °C em câmara úmida.

Quadro 2 - Relação dos anticorpos utilizados nas reações imunoistoquímicas das vias Notch, NF-kB e WNT.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
Beta catenina	14	1:3.000	BD Tranduction, cat #610154 San José, CA, EUA
Wnt5a	3B10	1:50.000	Abcam, cat# 86720 Cambridge, MA, EUA
NFKB p105-50	monoclonal feito em coelho	1:1.000	Epitomics, cat # 1559-1, Burlingame, Ca, EUA
Notch 1	A6	1:50	Thermo Scientific cat# MS- 1339, Fremont, CA, EUA

Em seguida as lâminas foram lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada e incubadas por 30 minutos a 37°C com Post Block (NovoLink Max Polymer RE 7260-k, Reino Unido). Lavagem com tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada e incubação com NovoLink Polymer por 30 minutos a 37 °C. Após as lâminas serem lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada, foram incubadas em solução substrato: 100 mg de 3,3 Diaminobenzidine

Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D5637 EUA); 1 ml de Dimetilsulfoxido (DMSO) 1 ml de H₂O₂ 6% (água oxigenada de 20 vol); 100 ml de PBS por 5 minutos a 37 °C ao abrigo da luz. As lâminas foram observadas ao microscópio óptico, identificando-se o desenvolvimento de precipitado castanho dourado como produto final da reação. As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por 3 minutos e contra coradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto. Novamente foram lavadas em água corrente e destilada, e imersas 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%) lavando em seguida em água corrente e destilada. A seguir as lâminas foram desidratadas em: etanol 80%, 30 segundos, etanol 95%, 30 segundos; etanol 100% 2 vezes 30 segundos cada; xilol 4 vezes, 30 segundos cada. Procedemos a montagem das lâminas em Etellan neu (Merck 1.07961, Alemanha)

O controle negativo foi processado similarmente pela omissão do anticorpo primário e espécimes de placenta foram usadas como controle positivo para Notch1, NF-kB p105-50, WNT5a e beta catenina.

4.2 LEITURA DAS LÂMINAS

A leitura das lâminas foi realizada por um patologista com experiência em oncologia ginecológica (FAS), utilizando-se a microscopia óptica convencional. Os casos de lesões precursoras foram classificados em lesões intraepiteliais de baixo grau (LIEBG) e alto grau (LIEAG). Quanto aos casos de carcinomas invasores, foi confirmada presença exclusiva da histologia carcinoma epidermóide, sendo excluídas demais histologias malignas.

A avaliação quantitativa foi realizada analisando-se a intensidade das expressões imunoistoquímicas do Notch1, NF-kB p50, Beta catenina e Wnt5a. Para as reações do Notch 1, NF-kB p50 e Wnt5a foram analisadas as expressões

citoplasmáticas. Para a reação da Beta-catenina foi analisada a sua expressão em membrana celular. A intensidade de expressão foi classificada em 4 categorias, sendo a ausência de expressão denominada de 0 (zero); expressão “fraca” de +1; expressão “moderada” de +2; expressão “forte” de +3. Para fins de análise estatística, realizou-se agrupamento em 2 categorias, sendo as expressões “0” e “+1” consideradas expressões negativas e “+2” e “+3” positivas para cada marcador.

A análise dos dados anatomopatológicos do carcinomas epidermóides (39 casos) foi realizada, correlacionando-se a expressão imunistoquímica dos marcadores Notch1, NF-kB p50, Beta catenina e WNT 5a com grau histológico, invasão linfovascular, embolização linfática, embolização vascular, infiltração perineural e metástase linfonodal.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as variáveis do estudo foram tratadas como dados categóricos, sendo que a variável de interesse será a expressão igual a positivo/negativo.

Estatísticas descritivas foram aplicadas para caracterizar a casuística onde as medidas de tendência central e de variabilidade foram utilizadas para descrever os dados numéricos e a distribuição de frequências para os dados categóricos.

Para verificar a associação entre a expressão positiva/negativa dos marcadores com relação às variáveis incluídas no estudo, cujos dados foram tratados como categorias, foi aplicado o teste de frequência do qui-quadrado e o teste exato de Fisher, onde pelo menos uma frequência esperada for menor do que 5. O nível de significância de 5% foi considerado para todos os testes. Os devidos intervalos de confiança de 95% foram obtidos.

5 RESULTADOS

5.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

As características demográficas e de hábitos de vida das 84 pacientes estudadas estão descritas na **Tabela 1**. As idades variaram entre 20 e 73 anos (média=43,5 anos; mediana=43 anos; dp=13,3). A raça branca foi mais frequente, perfazendo 75% (63 casos), seguidas pelas pacientes das raças amarela em 10,7% (9 casos), negra em 9,5% (8 casos) e parda em 4,8% (9 casos) do total das pacientes. O consumo do tabaco esteve presente em 36,9% das pacientes (31 casos) e o uso de anticoncepcional oral, atual ou pregresso foi encontrado em 13,1% das mulheres (11 casos).

Quarenta e cinco pacientes (53,6% dos casos) eram portadoras de neoplasia intraepitelial cervical. As idades das pacientes deste grupo variaram de 20 a 64 anos (média=36,9 anos, mediana=36 anos). Vinte e seis pacientes (57,7%) foram submetidas a conização com alta frequência do colo uterino (CAF) 17 pacientes (37,7%) a conização a frio e 2 pacientes (4,6%) a histerectomia total abdominal simples.

As lesões intraepiteliais de baixo grau (LIEBG) perfizeram um total de 17,9% (15 casos). As lesões intraepiteliais de alto grau (LIEAG) corresponderam a 35,7% dos casos (30 casos) enquanto as paciente portadoras de carcinoma invasivo do colo uterino foram 46,4% das pacientes (39 casos). As idades das

pacientes desse grupo variaram de 20 a 64 anos (média=36,9 anos; mediana=36 anos) (**Tabela 2**).

Todas as pacientes portadoras de carcinomas invasores foram submetidas a histerectomia radical com linfadenectomia pélvica (cirurgia de Wertheim-Meigs) e perfizeram um total de 39 casos (46,4% das pacientes do estudo). Suas idades variaram de 28 a 73 anos (média=51,1 anos; mediana=51 anos) (**Tabela 2**).

Tabela 1 - Distribuição da casuística de acordo com variáveis demográficas e hábitos de vida

Variável	Categoria / Medidas	TOTAL (Freq %)
Idade (anos)	N	84
	Intervalo	20 - 73
	Mediana	43
	Média	43,5
Raça	Branca	64 (75)
	Negra	8 (9,5)
	Parda	4 (4,8)
	Amarela	9 (10,7)
Tabagismo	Não	44 (52,4)
	Sim	25 (29,8)
	Ex-tabagista	6 (7,1)
	Ignorado	9 (10,7)
Uso de Anticoncepcional	Não	59 (70,2)
	Sim	11 (13,1)
	Ignorado	14 (16,7)

Tabela 2 - Distribuição da casuística de acordo com variáveis clínicas, anatomopatológicas e o tipo de tratamento

Variável	Categoria / Medidas	TOTAL (Freq %)
Cirurgia	N	84
	Conização Alta Freq (CAF)	26 (31)
	Conização a Frio	17 (20,2)
	Histerectomia Simples	2 (2,3)
	Histerectomia Radical	39 (46,4)
Tipo Histológico	LIEBG	15 (17,9)
	LIEAG	30 (35,7)
	CEC	39 (49,4)
Idade (anos)	Lesões Intraepiteliais (mediana)	36
	Variação	20 - 64
	CEC (mediana)	51
	Variação	28-73

(LIEBG – lesão intraepitelial de baixo grau; LIEAG – lesão intraepitelial de alto grau; CEC – carcinoma espinocelular; CAF – conização com alta frequência)

5.2 EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS NOTCH, NF- κ B, BETA CATENINA E WNT

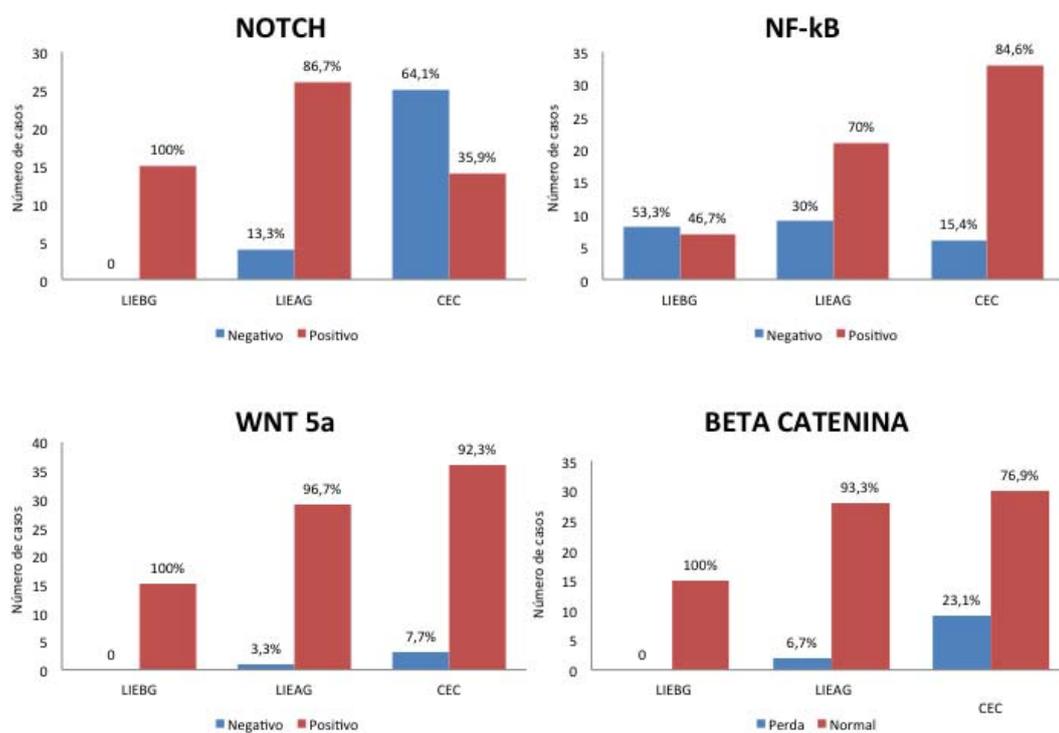
A distribuição dos casos de acordo com sua expressão, bem como a frequência de suas ocorrências estão representados na **Tabela 3**.

A distribuição de acordo com a intensidade da reação imunoistoquímica nos diferentes graus das lesões intraepiteliais e do carcinoma epidermóide de colo uterino foi representada graficamente na **Figura 10**. A **Figura 11** mostra a representação fotográfica das reações imunohistoquímicas nas diferentes lesões do colo uterino.

Tabela 3 – Resultado das expressões imunoistoquímicas dos marcadores Notch1, NF-kB p105, Wnt5a e Beta catenina de acordo com as lesões cervicais. (números absolutos e porcentagens)

Variável	CATEGORIA	LIEBG	LIEAG	CEC	TOTAL (%)	p valor
	N	15(17,9)	30(35,7)	39(46,4)	84 (100)	
NF-kB (citoplasma)	Ausente	8 (53,3)	9 (30,0)	6 (15,4)	23 (27,4)	0,005
	Presente	7 (46,7)	21(70,0)	33(84,6)	61(72,6)	
Notch (citoplasma)	Ausente	0 (0,0)	4 (13,3)	25(64,1)	29 (34,5)	0,0001
	Presente	15 (100)	26(86,7)	14(35,9)	55 (65,5)	
Wnt5a (citoplasma)	Ausente	0 (0,0)	1 (3,3)	3 (7,7)	4 (4,8)	0,207
	Presente	15(100)	29(96,7)	36(92,3)	80 (95,2)	
Beta-catenina (membrana)	Perda expressão	0 (0,0)	2 (6,7)	9 (23,1)	11 (13,1)	0,012
	Expressão normal	15(100)	28(93,3)	30(76,9)	73 (86,9)	

(LIEBG – lesão intraepitelial de baixo grau; LIEAG – lesão intraepitelial de alto grau; CEC – carcinoma epidermóide)



(LIEBG – lesão intraepitelial de baixo grau; LIEAG – lesão intraepitelial de alto grau; CEC – carcinoma espinocelular)

Figura 9 – Representação gráfica das expressões imunohistoquímicas dos marcadores Notch1, NF-kB p105, Wnt5a e Beta catenina nas diferentes lesões cervicais (em números absolutos).

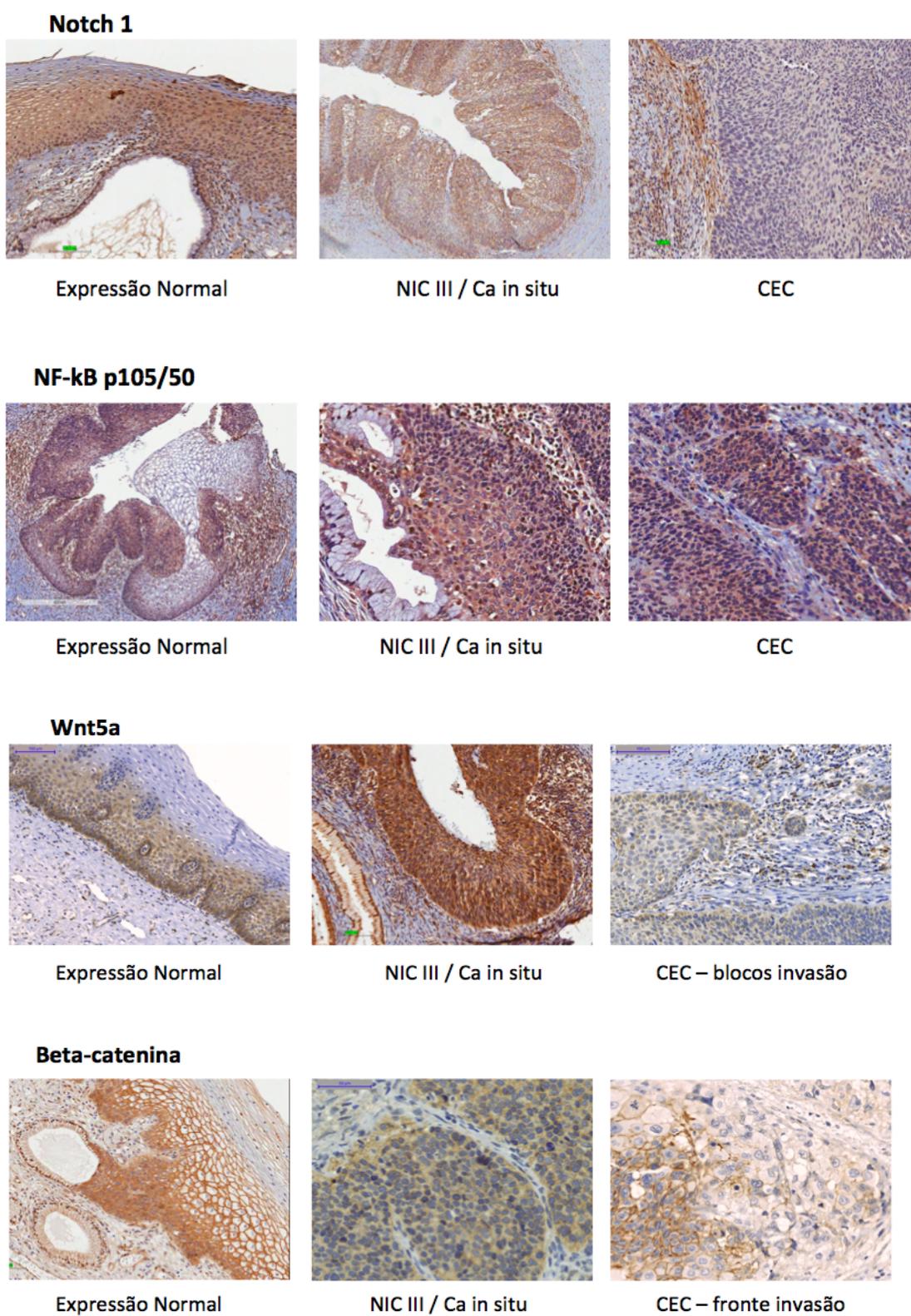
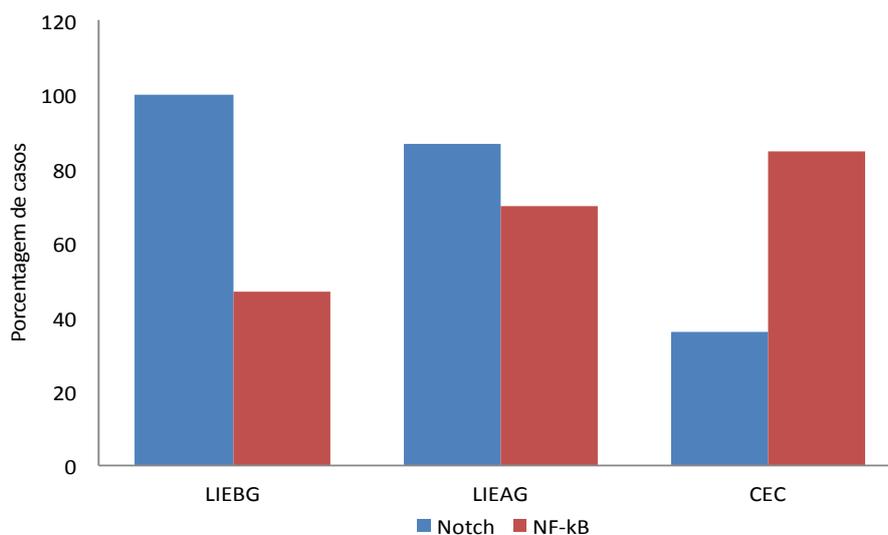


Figura 10 – Representação fotográfica das expressões imunoistoquímicas dos marcadores Notch1, NF-kB p105, Wnt5a e Beta catenina nas diferentes lesões cervicais.

O comportamento da expressão do Notch1 se deu de maneira inversamente proporcional a progressão das lesões. A positividade do marcador foi encontrada em 100% das LIEBG, 86,7% das LIEAG e 35,9% dos CEC ($p = 0,0001$).

Em contrapartida, a expressão citoplasmática do NF-kB mostrou correlação positiva com o grau de severidade das lesões anatomopatológicas sendo que a sua positividade foi encontrada em 46,7%, 70% e 84,6% das LIEBG, LIEAG e CEC respectivamente ($p = 0,005$).

A correlação entre as expressões imunoistoquímicas dos marcadores Notch 1 e NF-kB p50 foi representada graficamente na **Figura 11**.



(LIEBG – lesão intraepitelial de baixo grau; LIEAG – lesão intraepitelial de alto grau; CEC – carcinoma espinocelular)

Figura 11 – Representação gráfica da relação entre as expressões imunoistoquímicas positivas dos marcadores Notch1 e NF-kB p105, nas diferentes lesões cervicais (porcentagem de casos com expressão positiva).

As reações imunoistoquímicas do Wnt5a não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes lesões anatomopatológicas, sendo positividade de expressão citoplasmática encontrada em 100%, 96,7% e 92,3% nas LIEBG, LIEAG e CEC respectivamente ($p=0,207$). Nenhum caso demonstrou diferença na expressão nuclear do Wnt5a.

Quanto às reações imunoistoquímicas da Beta catenina, houve diferença estatisticamente significativa entre a perda de sua expressão em membrana celular com a progressão das lesões. Todas as LIEBG apresentaram expressões normais de Beta catenina na membrana celular. Por sua vez, as LIEAG apresentaram perda de expressão em 6,7% dos casos e os CEC em 23,1%. ($p=0,012$). Associado a esse evento, identificou-se aumento da expressão de beta catenina no citoplasma.

Somente a expressão do Wnt5a apresentou associação estatisticamente significativa com a embolização linfática. A associação foi inversamente proporcional, sendo caracterizada perda de expressão imunoistoquímica nos casos onde a embolização linfática foi detectada: expressão positiva em 89,9% dos casos sem embolização linfática versus 50% nos casos com embolização linfática. ($p = 0,014$)

Tabela 4 – Resultado das expressões imunohistoquímicas dos marcadores Notch1, NF-kB p105, Wnt5a e Beta catenina nos 39 casos de carcinoma espinocelular e seus dados anatomopatológicos (números absolutos e porcentagens).

Variável	Categoria	N = 39	Notch		NF-kB		WNT		Beta Catenina	
			Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Perda	Normal
Grau Histológico	Baixo Grau	3 (7,6)	2 (66,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (100)	1 (33,3)	2 (66,7)	0 (0,0)	3 (100)
	Alto Grau	36(92,4)	23 (63,9)	6 (16,7)	6 (16,7)	30(83,3)	8 (22,2)	28(77,8)	27 (75,0)	9 (25,0)
	p valor		1,00		1,00		0,556		1,00	
Invasão Linfovascular	Ausente	22(56,4)	14 (63,6)	4 (18,2)	4 (18,2)	18(81,8)	3 (13,6)	19(86,4)	18 (81,8)	4 (18,2)
	Presente	17(43,6)	11 (64,7)	2 (11,8)	2 (11,8)	15(88,2)	6 (35,3)	11(64,7)	12 (70,6)	5 (29,4)
	p valor		1,00		0,679		0,142		0,465	
Embolização Vascular	Ausente	37(94,9)	23 (62,2)	6 (16,2)	6 (16,2)	31(83,8)	9 (24,3)	28(75,7)	28 (75,7)	9 (24,3)
	Presente	2 (5,1)	2 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (100)	0 (0,0)	2 (100)	2 (100)	0 (0,0)
	p valor		0,528		1,00		1,00		1,00	
Embolização Linfática	Ausente	27(69,2)	16 (59,3)	4 (14,8)	4 (14,8)	23(85,2)	3 (11,1)	24(88,9)	22 (81,5)	5 (18,5)
	Presente	12(30,8)	9 (75,0)	2 (16,7)	2 (16,7)	10(83,3)	6 (50,0)	6 (50,0)	8 (66,7)	4 (33,3)
	p valor		0,477		1,00		0,014		0,416	
Metástase Linfododal	Ausente	26(66,6)	16 (61,5)	3 (11,5)	3 (11,5)	23(88,5)	4 (15,4)	22(84,6)	22 (84,6)	4 (15,4)
	Presente	13(33,4)	9 (69,2)	3 (23,1)	3 (23,1)	10(76,9)	5 (38,5)	8 (61,5)	8 (61,5)	5 (38,5)
	p valor		0,733		0,380		0,129		0,129	

6 DISCUSSÃO

O papel central do vírus HPV na carcinogênese do câncer de colo uterino foi solidamente estabelecido na literatura. Apesar disso, detalhes sobre as vias intracelulares envolvidas e seus potenciais terapêuticos permanecem desconhecidos.

Experimentos *in vitro* contribuíram para melhor compreensão dos fatores que interagem com as oncoproteínas do vírus HPV e seu papel na carcinogênese desta neoplasia, a qual apresenta expressivas taxas de incidência e prevalência, bem como de mortalidade nos países em desenvolvimento. Tais estudos *in vitro* predominam nas publicações que abordam as vias intracelulares do câncer de colo uterino, sendo os estudos *in vivo* em menor quantidade.

Não restam dúvidas sobre os benefícios de campanhas de rastreamento populacional, que permitem ações precoces com impacto importante na redução da mortalidade pela doença. Porém, nos casos onde o câncer de colo uterino já se encontra instalado, questões sobre morbidade dos tratamentos e a alta letalidade relacionada a doença emergem como importante questão de saúde pública.

O entendimento do papel do vírus do HPV na carcinogênese do câncer de colo uterino e da história natural da sua infecção permitiram o desenvolvimento das primeiras vacinas profiláticas. Duas vacinas foram desenvolvidas e testadas em grandes estudos internacionais, as quais produzem efeitos contra a infecção do HPV, compreendendo os vírus de alto risco 16 e 18 (bivalente) e os vírus 6 11 16 e 18 (quadivalente).

Ambas as vacinas demonstraram seu maior benefício em evitar o aparecimento das lesões intraepiteliais pré neoplásicas em populações de mulheres não expostas previamente a infecções pelo HPV. Além disso, alguns estudos apontam benefícios na vacinação de ambos os sexos em idade precoce, antecedendo o início de vida sexualmente ativa. Apesar de estudos sobre a eficácia e custo-efetividade da vacina em políticas de saúde coletiva, ainda faltam resultados a longo prazo sobre o real impacto na redução da mortalidade do câncer do colo uterino. Vacinas com maior abrangência sobre os demais subtipos virais do HPV ainda estão em desenvolvimento (CROSBIE et al. 2013).

Estudos clínicos sobre o assunto podem trazer maiores informações relacionadas às manifestações clínicas da doença, bem como o desenvolvimento de potenciais alvos terapêuticos, possivelmente combinados às atuais modalidades de tratamento empregadas.

Estudos realizados com os marcadores das vias Notch, NF- κ B e Wnt demonstraram seu envolvimento na carcinogênese de diversas neoplasias malignas, especialmente no câncer de colo uterino. O presente estudo demonstra resultados compatíveis com a literatura e pode ajudar a compreender passos adicionais para o desenvolvimento desta neoplasia (UREN et al. 2005; KATOH e KATOH 2007; NARISAWA-SAITO e KIYONO 2007; RAMPIAS et al. 2010).

6.1 EXPRESSÃO DA VIA NOTCH DURANTE A PROGRESSÃO DO CÂNCER DE COLO DE ÚTERO

A supressão da via Notch foi identificada no processo de carcinogênese de diversas neoplasias maligna (por exemplo tumores de pele – NICOLAS et al. 2003), inclusive no câncer de colo uterino (RANGANATHAN et al. 2011).

A diminuição de expressão imunoistoquímica do Notch nos carcinomas epidermóides invasores foi demonstrada em estudo de SUN et al. (2007). Em comparação com tecidos normais do colo uterino, onde a expressão do Notch foi normal, o citoplasma das células tumorais do carcinoma epidermóide demonstrou expressão significativamente menor, sugerindo efeito supressor desta via. A supressão do gene Notch1 também foi relacionada a desregulação da diferenciação de queratinócitos, em estudo com culturas celulares (RANGARAJAN et al. 2001).

TALORA et al. (2002 e 2005) apresentaram em dois estudos distintos resultados sugestivos do fator inibidor da proliferação celular exercido pelo gene Notch 1, estando a sua expressão e a presença de cofatores de sua via diminuídos em culturas de células de neoplasias malignas do colo uterino, infectadas com vírus do HPV.

Em artigo de revisão, NARISAWA-SAITO e KIYONO (2007) descreveram a inibição da expressão do gene Notch 1 regulada pela supressão do gene p53. Tal efeito é mediado pela presença das oncoproteínas E6 e E7 do vírus HPV, fato já demonstrado de maneira sólida na literatura.

Em carcinomas invasivos do colo uterino, a expressão imunoistoquímica do Notch foi identificada com intensidades diferentes em lesões de diferentes graus de

diferenciação celular. As lesões bem diferenciadas demonstraram expressões superiores a dos tumores indiferenciados, sugerindo existir supressão desta via com a evolução do grau histológico (ZAGOURAS et al. 1995; TALORA et al. 2005).

Apesar do efeito supressor do Notch ter sido evidenciado em diversos experimentos, outros autores sugerem que a mesma via possua efeito estimulador sobre diversas neoplasias, inclusive no câncer cervical. Tal fato pode ser justificado pela via do Notch possuir quatro diferentes genes, cujas expressões podem causar efeitos distintos sobre o destino celular (YEASMIN et al. 2010).

O presente estudo demonstra a diminuição gradativa da expressão imunohistoquímica do Notch 1 em amostras de tecidos neoplásicos do colo uterino. Nas LIEBG não houve registro da perda de sua expressão. Por sua vez, as LIEAG demonstraram perda de expressão em cerca de 13% e no carcinoma invasor sua positividade foi somente da ordem de 36% ($p = 0,0001$). Os resultados sugerem um fator inibidor exercido pela via do Notch 1, o qual vai perdendo sua expressão com a evolução das lesões em direção ao carcinoma invasor.

Nesta coorte, não houve diferenças significativas nas expressões entre os diferentes graus histológicos de carcinoma epidermóide, o que pode ser justificado pela pequena quantidade de casos de lesões de baixo grau histológico de malignidade, dificultando assim melhor análise. Não houve correlação significativa entre a expressão do Notch com o grau histológico, invasão linfovascular, embolização linfática, embolização vascular ou metástase linfonodal nos carcinomas invasores.

6.2 EXPRESSÃO DA VIA NF-kB DURANTE A PROGRESSÃO DO CÂNCER DE COLO DE ÚTERO

A via NF-kB encontra-se ativada em diversas neoplasias, incluindo o câncer de colo uterino (NAIR et al. 2003; DOLCET et al. 2005; LOERCHER et al. 2005; CHATURVEDI et al. 2011). Diversos experimentos avaliaram a dosagem das formas precursoras desta via, bem como de seus fatores intracelulares, registrando sua atividade em subsítios celulares (NAIR et al. 2003; BRANCA et al. 2006).

HAVARD et al. (2005), através da análise da presença das proteínas virais E6 e E7, demonstraram em seu experimento que a localização citoplasmática do NF-kB p105 estava aumentada em cultura celular de queratinócitos infectados pelo vírus HPV de alto risco tipo 16.

A atividade desta via e sua relação com a atividade dos vírus HPV de alto risco também foi demonstrada por BRANCA et al. (2006). Neste experimento a expressão citoplasmática do NF-kB p 105 demonstrou-se progressivamente maior com a evolução das lesões precursoras para a lesão invasora do colo uterino, ocorrida em 39% destes últimos. O aumento da expressão nuclear do NF-kB foi relacionada de maneira mais forte com a presença de LIEAG e carcinoma invasor, muito embora casos com forte expressão nuclear foram encontrados em somente 8,8% das amostras. A expressão nuclear também se correlacionou com a presença de HPV de alto risco.

A expressão imunohistoquímica avaliada por NAIR et al. (2003) em tecidos de colo uterino contendo epitélios normais, lesões precursoras e carcinoma invasor, demonstrou importante padrão de migração para o núcleo do marcador NF-kb p 105.

Houve diminuição da expressão citoplasmática, seguida de aumento gradativo da expressão nuclear do marcador com a evolução sequencial das lesões cervicais. Foram também identificadas expressões nucleares gradativamente maiores com a perda de diferenciação celular dentre os carcinomas invasores.

LI et al. (2009) correlacionaram a atividade do NF-kB com fatores prognósticos do câncer cervical, através da análise da expressão imunohistoquímica de proteínas desta família, incluindo NF-kB p105. A ativação da via foi diretamente proporcional a progressão das lesões precursoras para o carcinoma invasor e correlacionou-se com tamanho tumoral, profundidade de invasão e metástase linfonodal. Embora o impacto na sobrevida global não tenha sido demonstrado neste estudo, acredita-se haver forte associação entre a ativação da via NF-kB com neoplasias de prognóstico ruim. A associação com fatores prognósticos não foi encontrada no estudo realizado por BRANCA et al. (2006) descrito anteriormente.

RAMDASS et al. (2006) descreveram a associação das vias Notch e NF-kB em tumores de colo uterino. Neste estudo, diferentemente dos experimentos anteriormente discutidos, demonstrou-se a ativação da via Notch na evolução sequencial das lesões cervicais, sendo expressão citoplasmática muito fraca em amostras de tecido normal, com aumento gradativo de expressão imunohistoquímica durante a evolução sequencial para carcinoma invasivo. Através de técnicas de imunofluorescência, imunohistoquímica e Western Blot, foram descritas expressões de outros componentes da via Notch (Jagged, Hes1, pAKT) com alterações compatíveis com a estimulação dessa via. Por outro lado, o mesmo experimento também analisou as expressões de componentes da via NF-kB e discutiu a sua correlação com a via Notch. Além da relação positiva entre a coexpressão dos marcadores de ambas as

vias, este estudo demonstrou atividade da via NF-kB mediada pela ativação do Notch. Este achado corrobora com o fato das alterações da via Notch ser o evento inicial deflagrador de alterações subsequentes em demais vias intracelulares implicadas na oncogênese.

O presente estudo demonstrou aumento gradativo na expressão citoplasmática do NF-kB p105 durante a progressão sequencial das lesões do colo uterino, com diferença estatística significativa ($p = 0,018$). Não foram encontradas diferenças na expressão nuclear deste marcador nos diferentes graus de lesões cervicais. Sugere-se assim, uma ativação da via do NF-kB que se associa com a progressão da doença precursora para a doença invasora do colo uterino.

Nenhuma correlação pode ser realizada entre as expressões e os dados anatomopatológicos dos carcinomas invasores, como grau histológico, invasão linfovascular, embolização linfática, embolização vascular e metástase linfonodal.

6.3 EXPRESSÃO DA VIA WNT DURANTE A PROGRESSÃO DO CÂNCER DE COLO DE ÚTERO

A ativação da via WNT foi identificada em diversas neoplasias malignas, sendo implicada como um “segundo passo” fundamental na gênese do carcinoma de colo uterino (UREN et al. 2005; PLASENCIA et al. 2008). Consequentemente, a fosforilação da beta catenina citoplasmática ocorre, culminando em sua migração para o núcleo, onde vai estimular a expressão de genes relacionados ao crescimento e proliferação celular (KLAUS e BIRCHMEIER 2008). Tal evento é a “marca registrada” da via canônica do WNT (RAMPIAS et al. 2010).

Como possível fator causal da estimulação da via WNT, RAMPIAS et al. (2010) evidenciaram o papel das oncoproteínas E6 e E7 em culturas celulares de carcinomas de orofaringe infectadas com HPV 16. Neste experimento *in vitro* foi evidenciado o aumento da concentração de beta catenina nuclear com consequente diminuição de sua expressão citoplasmática.

De forma análoga, UREN et al. (2005) realizaram experimento *in vitro* com queratinócitos imortalizados pelo vírus HPV e com tecidos de carcinomas invasores de colo uterino e suas lesões precursoras. O aumento na expressão nuclear do beta catenina foi bem caracterizado nos carcinomas invasores, ao contrário das lesões precursoras, onde a concentração citoplasmática predominou. Em grupo de células controles, sem a presença do HPV, a estimulação da via WNT não foi suficiente para a transformação maligna dos queratinócitos. Postulou-se então um papel de “second hit” da via WNT necessário para carcinogênese, tendo como efeito deflagrador a presença do vírus HPV.

No presente estudo, as expressões imunoistoquímicas do Wnt5a não demonstraram correlação significativa com a progressão das lesões precursoras para o carcinoma invasor ($p = 0,207$). Todas as lesões apresentaram elevada taxa de expressão citoplasmática do Wnt5a. Em contrapartida, a expressão da beta catenina na membrana celular apresentou decréscimo de sua intensidade com a evolução sequencial das lesões, associada ao aumento de sua expressão citoplasmática. As LIEBG apresentaram expressão normal em 100% dos casos enquanto no carcinoma invasor houve perda de expressão do beta catenina em até 23% dos casos ($p=0,012$). Apesar de bem da perda de expressão de membrana celular e do aumento no citoplasma estarem bem caracterizados, não houve identificação da expressão

nuclear da beta catenina, o que sugeriria a migração intracelular extensamente descrita na literatura (UREN et al. 2005; DUAN et al. 2006; KLAUS e BIRCHMEIER 2008; PLASENCIA et al. 2008; RAMPIAS et al. 2010).

A correlação entre as vias Notch, NF-kB e WNT foi descrita anteriormente por diversos autores em estudos in vitro (DUAN et al. 2006; RAMDASS et al. 2007; SONG et al. 2008; KATOH e KATOH 2009a e b).

Em relação aos achados de expressão do Wnt e fatores anatomopatológicos dos carcinomas invasores, houve correlação com significância estatística entre a perda da expressão do Wnt5a e a presença de embolização linfática ($p = 0,014$). Tal achado não pode ser correlacionado com a evolução anatomopatológica, uma vez que houve perda da expressão do marcador onde a embolização linfática foi encontrada.

A relação de equilíbrio entre essas vias foi implicada como um fator de homeostase, e o desbalanço entre seus componentes seria um evento crucial no processo inflamatório crônico envolvido na carcinogênese (KATOH e KATOH 2009a e b).

DUAN et al. (2006) descreveram o efeito anti proliferativo da via Notch 1 e sua relação com a via WNT / beta catenina em carcinoma de cavidade oral. Neste experimento células malignas de carcinomas de língua sofreram ativação artificial da via Notch e foram duplamente analisadas: em culturas celulares e após sua injeção em camundongos. A ativação do Notch causou parada do ciclo celular e aumento da apoptose. Tais eventos foram correlacionados com a ativação da via WNT. A possível ativação da via Notch causou inativação da via WNT em carcinomas de cavidade oral.

Outra observação importante de DUAN et al. (2006) foi a atividade desempenhada por elementos dessas vias em outros tipos de tumores malignos (leucemias, linfomas, carcinomas basocelulares de pele, câncer de pulmão de pequenas células, carcinoma hepatocellular e câncer de colo uterino relacionados a infecção por HPV), onde o papel de promotor ou supressor da carcinogênese ocorreria de formas distintas e dependentes do contexto celular.

O presente estudo demonstrou associação entre a expressão imunohistoquímica dos marcadores Notch1, NF-kB p105/50, Wnt5a e beta catenina nas lesões sequenciais do colo uterino (LIEBG, LIEAG e CEC). De acordo com os resultados, foram evidenciadas expressões progressivamente menores do Notch associadas ao aumento das expressões dos marcadores das vias NF-kB e WNT. A correlação foi fortemente identificada entre as expressões das proteínas Notch1 e NF-kB p105/50, sugerindo atividades antagônicas dessas vias intracelulares. No caso da via WNT, a estimulação da via foi identificada através da expressão da beta catenina. Apesar de não identificarmos a migração nuclear da beta catenina, houve perda de sua expressão na membrana celular associada ao aumento de sua expressão no citoplasma, fato que sugere a ativação desta via. Apesar da associação positiva da beta catenina, o marcador Wnt5a não demonstrou alterações significantes de expressão nas diferentes lesões cervicais. Tal fato pode ser explicado por uma possível limitação técnica relacionada a este reagente.

As diferenças nas expressões imunohistoquímicas encontradas neste experimento, bem como as discordâncias em relação aos trabalhos previamente publicados podem ser explicadas por algumas questões metodológicas utilizadas. O método de avaliação imunohistoquímica, apesar de facilmente executável e de

apresentar menores custos, apresenta limitações devido a imprecisão de seus resultados. Por outro lado a validação de resultados em estudos imunoistoquímicos poderia viabilizar a realização deste método na prática clínica, facilitando questões relacionadas ao diagnóstico, contribuindo para entendimento de fatores prognósticos e, eventualmente interferindo na decisão terapêutica das pacientes com câncer de colo uterino.

Outra limitação deste experimento reside no fato das análises terem sido realizadas de forma retrospectiva, com o uso de amostras teciduais fixadas em parafina, o que pode ter prejudicado tanto na obtenção de material válido, quanto na expressão dos resultados. Estudos mais minuciosos, como análises de material genético extraído de tecido a fresco são alternativas para contornar tais deficiências.

A escassez de estudos em produtos de peças operatórias também pode ser implicada como fator limitante na discussão dos achados, principalmente no que diz respeito a via Notch. Seu papel estimulador ou supressor da oncogênese continua não esclarecido. Apesar do contexto celular (diferentes tipos de neoplasia) ser implicado como uma causa central desses resultados díspares, a literatura ainda carece de informações sobre o real papel desta via celular. Em contrapartida, os resultados originados no presente estudo podem e devem ser valorizados para melhor entendimento do comportamento da via Notch, especialmente no que diz respeito a sua associação com as outras vias aqui abordadas.

A análise das demais vias realizadas no presente estudo (NF-kB e WNT) têm resultados semelhantes aos descritos na literatura, com diferenças fundamentalmente relacionadas às características do método imunoistoquímico. Nesse caso, o padrão de migração do NF-kB p105 e da beta catenina no núcleo não pode ser identificado,

apesar da diferença de expressão encontrada nas diferentes lesões cervicais ter sido demonstrada de maneira significativa.

A correlação entre os marcadores das vias Notch, NF-kB e WNT e os aspectos anatomopatológicos dos carcinomas invasores pode ter sido dificultada pelo pequeno número de casos (39 casos). Não foi possível realizar associações significativas com fatores prognósticos já estabelecidos na literatura, como grau histológico, embolização linfática e vascular e metástases linfonodais (CREASMAN e KOHLER 2004; MONK et al. 2007; PALLAVI et al. 2012).

Apesar das limitações apontadas, o estudo apresentou achados que podem ser utilizados para melhor compreensão da carcinogênese do câncer de colo uterino. As vias intracelulares aqui abordadas têm sido relacionadas à deflagração do processo de transição epitélio mesênquima (EMT), fenômeno apontado como crucial no desenvolvimento e na progressão de diversas neoplasias malignas, inclusive no câncer de colo uterino (THIERY e SLEEMAN 2006; KATOH e KATOH 2007; MIMEAULT e BATRA 2007; DE WEVER et al. 2008; ZHAU et al. 2008; TIMMERMAN et al. 2009; CHEN et al. 2010).

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, observa-se que as vias do Notch, NF-kB e WNT encontram-se alteradas nos diferentes graus evolutivos das lesões do colo uterino através da análise das proteínas Notch1, NF-kB p105/50, Wnt5a e beta catenina.

Foi evidenciada a supressão da via Notch através expressão imunohistoquímica do Notch1 progressivamente menor na evolução das lesões intraepiteliais para o carcinoma epidermóide invasor do colo do útero.

A via NF-kB apresentou-se estimulada durante o processo evolutivo das lesões do colo uterino, através da expressão imunohistoquímica progressivamente maior da proteína NF-kB p 105/50.

A via WNT também apresentou-se estimulada, com a evidência da perda progressiva da expressão imunohistoquímica de membrana da beta catenina.

As expressões imunohistoquímicas das proteínas das vias do Notch, NF-kB e WNT não apresentam correlação com as variáveis anatomopatológicas do carcinoma invasor do colo uterino.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Apgar BS, Zoschnick L, Wright TC Jr. The 2001 Bethesda System terminology. **Am Fam Physician** 2003; 68:1992-8.

Badiglian Filho L, Oshima CT, Lima FO, et al. Canonical and noncanonical Wnt pathway: a comparison among normal ovary, benign ovarian tumor and ovarian cancer. **Oncol Rep** 2009; 21:313-20.

Baiocchi G, Bergamini MD, Fukazawa EM, Oliveira RA, Faloppa CC, Kumagai LY, Badiglian-Filho L, Pelizzon AC, Maia MA, Jacinto AA, Soares FA, Lopes A. Prognostic value of nuclear factor κ B expression in patients with advanced cervical cancer undergoing radiation therapy followed by hysterectomy. **J Clinical Pathology** 2012; 65: 614-18.

Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. **Cell** 2000; 103:311-20.

Björklund P, Akerström G, Westin G. An LRP5 receptor with internal deletion in hyperparathyroid tumors with implications for deregulated WNT/beta-catenin signaling. **PLoS Med** 2007; 4:e328.

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

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

Branca M, Giorgi C, Ciotti M, et al. HPV-Pthogen ISS Study Group. Upregulation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia, but is not an independent predictor of high-risk human papillomavirus or disease outcome in cervical cancer. **Diagn Cytopathol** 2006; 34:555-63.

Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2006; 7:678-89.

Caldwell GM, Jones C, Gensberg K, et al. The Wnt antagonist sFRP1 in colorectal tumorigenesis. **Cancer Res** 2004; 64:883-8.

Chaturvedi MM, Sung B, Yadav VR, Kannappan R, Aggarwal BB. NF- κ B addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. **Oncogene** 2011; 30:1615-30.

Chen J, Imanaka N, Griffin JD. Hypoxia potentiates Notch signaling in breast cancer leading to decreased E-cadherin expression and increased cell migration and invasion. **Br J Cancer** 2010; 102:351-60.

Creasman WT, Kohler MF. Is lymph vascular space involvement an independent prognostic factor in early cervical cancer? **Gynecol Oncol** 2004; 92:525-9.

Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet** 2013; 382:889-99.

De La O JP, Emerson LL, Goodman JL, et al. Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2008; 105:18907-12.

De Wever O, Pauwels P, De Craene B, et al. Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. **Histochem Cell Biol** 2008; 130:481-94.

Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF- κ B in development and progression of human cancer. **Virchows Arch** 2005; 446:475-82.

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

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

Duan L, Yao J, Wu X, Fan M. Growth suppression induced by Notch1 activation involves Wnt- β -catenin down-regulation in human tongue carcinoma cells. **Biol Cell** 2006; 98:479-90.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. **GLOBOCAN 2008 v2.0, cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10**. 2010. Available from: <URL:<http://globocan.iarc.fr>> [2013 nov 25].

Fre S, Pallavi SK, Huyghe M, et al. Notch and Wnt signals cooperatively control cell proliferation and tumorigenesis in the intestine. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009; 106:6309-14

Guimarães AP, Rocha RM, da Cunha IW, et al. Prognostic impact of adenomatous polyposis coli gene expression in osteosarcoma of the extremities. **Eur J Cancer** 2010; 46:3307-15.

Hanlon L, Avila JL, Demarest RM, et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in a model of K-ras-induced pancreatic ductal adenocarcinoma. **Cancer Res** 2010; 70:4280-6.

Harrison H, Farnie G, Howell SJ, et al. Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch4 receptor. **Cancer Res** 2010; 70:709-18

Havard L, Rahmouni S, Boniver J, Delvenne P. High levels of p105 (NFkB1) and p100 (NFkB2) proteins in HPV16-transformed keratinocytes: role of E6 and E7 oncoproteins. **Virology** 2005; 331:357-66.

Hellström M, Phng LK, Hofmann JJ, et al. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. **Nature** 2007; 445:776-80.

Huang D, Du X. Cross talk between tumor cells and microenvironment via Wnt pathway in colorectal cancer dissemination. **World J Gastroenterol** 2008; 14:1823-27.

Hulleman E, Quarto M, Vernell R, et al. A role for the transcription factor HEY1 in glioblastoma. **J Cell Mol Med** 2009; 13:136-46.

James MA, Lee JH, Klingelutz AJ. Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappaB, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner. **J Virol** 2006; 80:5301-7.

Jin YH, Kim H, Ki H, et al. Beta-catenin modulates the level and transcriptional activity of Notch1/NICD through its direct interaction. **Biochim Biophys Acta** 2009; 1793:290-9.

Katoh M, Katoh M. AP1- and NF-kappaB-binding sites conserved among mammalian WNT10B orthologs elucidate the TNFalpha-WNT10B signaling loop implicated in carcinogenesis and adipogenesis. **Int J Mol Med** 2007; 19:699-703.

Katoh M, Katoh M. Transcriptional mechanisms of WNT5A based on NF-kappaB, Hedgehog, TGFbeta, and Notch signaling cascades. **Int J Mol Med** 2009a; 23:763-9.

Katoh M, Katoh M. Transcriptional regulation of WNT2B based on the balance of Hedgehog, Notch, BMP and WNT signals. **Int J Oncol** 2009b; 34:1411-5.

Kirikoshi H, Sekihara H, Katoh M. Expression of WNT14 and WNT14B mRNAs in human cancer, up-regulation of WNT14 by IFN γ and up-regulation of WNT14B by beta-estradiol. **Int J Oncol** 2001; 19:1221-5.

Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. **Nat Rev Cancer** 2008; 8:387-98.

Korinek V, Barker N, Morin PJ, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC $^{-/-}$ colon carcinoma. **Science** 1997; 275:1784-7.

Kovall RA. More complicated than it looks: assembly of Notch pathway transcription complexes. **Oncogene** 2008; 27:5099-109.

Lefort K, Mandinova A, Ostano P, et al. Notch1 is a p53 target gene involved in human keratinocyte tumor suppression through negative regulation of ROCK1/2 and MRCK α kinases. **Genes Dev** 2007; 21:562-77.

Li J, Jia H, Xie L, et al. Association of constitutive nuclear factor-kappaB activation with aggressive aspects and poor prognosis in cervical cancer. **Int J Gynecol Cancer** 2009; 19:1421-6.

Lichtig H, Gilboa DA, Jackman A, et al. HPV16 E6 augments Wnt signaling in an E6AP-dependent manner. **Virology** 2010; 396:47-58.

Loercher A, Lee TL, Ricker JL, et al. Nuclear factor-kappaB is an important modulator of the altered gene expression profile and malignant phenotype in squamous cell carcinoma. **Cancer Res** 2004; 64:6511-23.

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

Maliekal TT, Bajaj J, Giri V, Subramanyam D, Krishna S. The role of Notch signaling in human cervical cancer: implications for solid tumors. **Oncogene** 2008; 27:5110-4.

Mimeault M, Batra SK. Interplay of distinct growth factors during epithelial-mesenchymal transition of cancer progenitor cells and molecular targeting as novel cancer therapies. **Ann Oncol** 2007; 18:1605-19.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **INCA e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2014**. Disponível em: <URL:http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014> [2014 jan 12]

Mittal S, Subramanyam D, Dey D, Kumar R, Rangarajan A. Cooperation of Notch and Ras/MAPK signaling pathways in human breast carcinogenesis. **Mol Cancer** 2009; 8:128.

Monk BJ, Tian C, Rose PG, Lanciano R. Which clinical/pathologic factors matter in the era of chemoradiation as treatment for locally advanced cervical carcinoma? Analysis of two Gynecologic Oncology Group (GOG) trials. **Gynecol Oncol** 2007; 105:427-33.

Mullendore ME, Koorstra JB, Li YM, et al. Ligand-dependent Notch signaling is involved in tumor initiation and tumor maintenance in pancreatic cancer. **Clin Cancer Res** 2009; 15:2291-301.

Mungamuri SK, Yang X, Thor AD, Somasundaram K. Survival signaling by Notch1: mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent inhibition of p53. **Cancer Res** 2006; 66:4715-24.

Nakamura T, Tsuchiya K, Watanabe M. Crosstalk between Wnt and Notch signaling in intestinal epithelial cell fate decision. **J Gastroenterol** 2007; 42:705-10.

Nam DH, Jeon HM, Kim S, et al. Activation of notch signaling in a xenograft model of brain metastasis. **Clin Cancer Res** 2008; 14:4059-66.

Nair P, Somasundaram K, Krishna S. Activated Notch1 inhibits p53-induced apoptosis and sustains transformation by human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes through a PI3K-PKB/Akt-dependent pathway. **J Virol** 2003; 77:7106-12.

Nicolas M, Wolfer A, Raj K, et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. **Nat Genet** 2003; 33:416-21.

Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. **Cancer Sci** 2007; 98:1505-11.

Okino K, Nagai H, Hatta M, et al. Up-regulation and overproduction of DVL-1, the human counterpart of the *Drosophila* dishevelled gene, in cervical squamous cell carcinoma. **Oncol Rep** 2003; 10:1219-23.

Osipo C, Golde TE, Osborne BA, Miele LA. Off the beaten pathway: the complex cross talk between Notch and NF-kappaB. **Lab Invest** 2008; 88:11-7

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

Pallavi VR, Devi KU, Mukherjee G, Ramesh C, Bafna UD. Relationship between lymph node metastases and histopathological parameters in carcinoma cervix: a multivariate analysis. **J Obstet Gynaecol** 2012; 32:78-80.

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

Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix and endometrium. **Int J Gynecol Obstet** 2009; 105:103-4.

Plasencia CP, Gonzales AD, Tavera BA. Second hit in cervical carcinogenesis process: involvement of wnt/beta catenin pathway. **Int Arch Med** 2008; 1:10.

Plentz R, Park JS, Rhim AD, et al. Inhibition of gamma-secretase activity inhibits tumor progression in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Gastroenterology** 2009; 136:1741-9.e6.

Polakis P. Wnt signaling and cancer. **Genes Dev** 2000; 14:1837-51.

Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumor suppressor? **Nat Rev Cancer** 2003; 3:756-67.

Ramdass B, Maliekal TT, Lakshmi S, et al. Coexpression of Notch1 and NF-kappaB signaling pathway components in human cervical cancer progression. **Gynecol Oncol** 2007; 104:352-61.

Rampias T, Boutati E, Pectasides E, et al. Activation of Wnt signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncogenes in HPV16-positive oropharyngeal squamous carcinoma cells. **Mol Cancer Res** 2010; 8:433-43.

Ranganathan P, Weaver KL, Capobianco AJ. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. **Nat Rev Cancer** 2011; 11:338-51.

Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, et al. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. **EMBO J** 2001; 20:3427-36.

Rodilla V, Villanueva A, Obrador-Hevia A, et al. Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009; 106:6315-20.

Shou J, Ross S, Koeppen H, de Sauvage FJ, Gao WQ. Dynamics of notch expression during murine prostate development and tumorigenesis. **Cancer Res** 2001; 61:7291-7.

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

Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA** 2002; 287:2114-9.

Song LL, Peng Y, Yun J, et al. Notch-1 associates with IKKalpha and regulates IKK activity in cervical cancer cells. **Oncogene** 2008; 27:5833-44.

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

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

Suchting S, Freitas C, le Noble F, et al. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2007; 104:3225-30.

Sun L, Zhan Q, Zhang W, Song Y. Aberrant expression of Notch1 in cervical cancer. **Chinese J Clin Oncol** 2007; 1:36-41.

Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. **Nat Genet** 2004; 36:417-22.

Terasaki H, Saitoh T, Shiokawa K, Katoh M. Frizzled-10, up-regulated in primary colorectal cancer, is a positive regulator of the WNT - beta-catenin - TCF signaling pathway. **Int J Mol Med** 2002; 9:107-12.

Talora C, Sgroi DC, Crum CP, Dotto GP. Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation. **Genes Dev** 2002; 16:2252-63.

Talora C, Cialfi S, Segatto O, et al. Constitutively active Notch1 induces growth arrest of HPV-positive cervical cancer cells via separate signaling pathways. **Exp Cell Res** 2005; 305:343-54.

Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2006; 7:131-42.

Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. **Oncogene** 2003; 22:1225-37.

Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, et al. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. **Genes Dev** 2004; 18:99-115.

Uren A, Fallen S, Yuan H, et al. Activation of the canonical Wnt pathway during genital keratinocyte transformation: a model for cervical cancer progression. **Cancer Res** 2005; 65:6199-206.

van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, et al. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. **Nature** 2005; 435:959-63.

Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C, et al. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. **Nat Med** 2000; 6:1278-81.

Villa LL. Biology of genital human papillomaviruses. **Int J Gynecol Obstet** 2006; 94:S3-S7.

Veeraraghavalu K, Pett M, Kumar RV, et al. Papillomavirus-mediated neoplastic progression is associated with reciprocal changes in JAGGED1 and manic fringe expression linked to notch activation. **J Virol** 2004; 78:8687-700.

Wang L, Qin H, Chen B, Xin X, Li J, Han H. Overexpressed active Notch1 induces cell growth arrest of HeLa cervical carcinoma cells. **Int J Gynecol Cancer** 2007; 17:1283-92.

Wang C, Qi R, Li N, et al. Notch1 signaling sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells by inhibiting Akt/Hdm2-mediated p53 degradation and up-regulating p53-dependent DR5 expression. **J Biol Chem** 2009; 284:16183-90.

Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. **Science** 2004; 306:269-71.

Whelan JT, Kellogg A, Shewchuk BM, Hewan-Lowe K, Bertrand FE Notch-1 signaling is lost in prostate adenocarcinoma and promotes PTEN gene expression. **J Cell Biochem** 2009; 107:992-1001.

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

Wright TC, Ferenczy A, Kurman RJ. Precancerous lesions of the cervix. In: Kurman RJ, Blaustein A, editors. **Blaustein's pathology of the female genital tract**. 5th ed. Baltimore: Springer-Verlag; 2002. p.253-324.

Yao J, Duan L, Fan M, Yuan J, Wu X. Notch1 induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical cancer cells: involvement of nuclear factor kappa B inhibition. **Int J Gynecol Cancer** 2007; 17:502-10.

Yeasmin S, Nakayama K, Rahman MT, et al. Expression of nuclear Notch3 in cervical squamous cell carcinomas and its association with adverse clinical outcomes. **Gynecol Oncol** 2010; 117:409-16.

Xu P, Qiu M, Zhang Z, et al. The oncogenic roles of Notch1 in astrocytic gliomas in vitro and in vivo. **J Neurooncol** 2010; 97:41–51.

Zagouras P, Stifani S, Blaumueller CM, Carcangiu ML, Artavanis-Tsakonas S. Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. **Proc Natl Acad Sci USA** 1995; 92:6414-18.

Zhang A, Măner S, Betz R, et al. Genetic alterations in cervical carcinomas: frequent low-level amplifications of oncogenes are associated with human papillomavirus infection. **Int J Cancer** 2002; 101:427-33.

Zhou HE, Odero-Marah V, Lue HW, et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer: lessons learned from ARCaP model. **Clin Exp Metastasis** 2008; 25:601-10.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

São Paulo, 29 de Outubro de 2010.

Ao
Dr. Fernando Augusto Soares

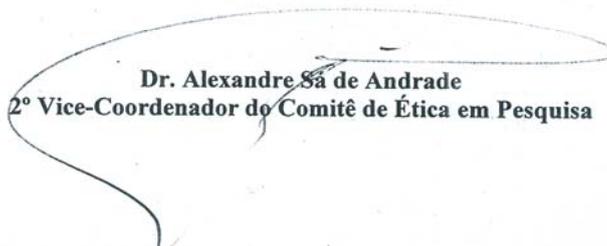
Ref.: Projeto de Pesquisa n°. 1472/10
“Análise imunohistoquímica das Vias Notch, Wnt, Hedgehog e NF-kB em lesões pré-invasoras e invasoras do colo uterino”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 26/10/2010, **aprovaram** a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e esclarecido;
- Declaração sobre os dados coletados, publicação dos dados e propriedade das informações geradas;
- Declaração sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e propriedade das Informações Geradas;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência do Departamento de Ginecologia.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Dr. Alexandre Sá de Andrade
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 - Ficha Coleta de Dados

Neoplasias Intraepiteliais

1. Caso ID
2. Registro Hospitalar RGH
3. Idade (anos)
4. Raça: (1)Branca (2)Negra (3)Outras
5. Tabaco: (0)Não (1)Sim (2)Ex-Tabagista (3)Ignorado
6. Anticoncepcional: (1)Sim (0)Não
7. AP: (1)NIC I (2)NIC II (3)NICIII
8. Data da Cirurgia - -
9. Tipo de Cirurgia
(0) Sem tratamento (1) Cirurgia de Alta Frequência
(2) Conização á frio (3)Histerectomia
10. Margens: (0)livres (1)Exíguas (2)Comprometidas
11. Recorrência (0)Não (1)Sim
12. Data Recorrência - -
13. Tratamento da Recorrência:
(1) Sem Tratamento (2)Re-Conização (3)Histerectomia
14. Situação do último Follow-up:
(1) Vivo sem doença (2)Vivo com doença (3)Perdido de Vista
15. Numero do anatomo.....

Anexo 3 - Ficha de coleta de dados II

REGISTRO

NOME: _____

ADMISSÃO:

1. ADMISSÃO (data) [] admissão

DADOS DEMOGRÁFICOS:

2. IDADE [] idade

3. COR. (1) branca (2) negra (3) parda (4) amarela (99) ignorado [] cor

4. ESTADO CIVIL:

(1) solteira (2) casada (3) separada (4) viúva (99) Ignorado [] civil

5. ESCOLARIDADE.

(0) analf. (1) 1º completo (2) 1º incompleto (3) 2º completo (4) 2º incompleto (5) superior comp. (6) superior incomp. (99) ignorado [] escola

DADOS CLÍNICOS:

6. SINTOMAS Sintomas (0) não (1) sim (99) ignorado [] sintomas

Sangramento (0) não (1) sim (99) ignorado [] sangue

Dor (0) não (1) sim (99) ignorado [] dor

Secreção (0) não (1) sim (99) ignorado [] secreção

Odor (0) não (1) sim (99) ignorado [] odor

Prurido (0) não (1) sim (99) ignorado [] prurido

Outros (0) não (1) sim [] outro

Qual (outros) [] qual

7. DURAÇÃO DOS SINTOMAS (meses) (99) ignorado [] duração

8. MENARCA (idade) (99) ignorado [] menarca

9. MENOPAUSA (idade) (0) se ainda no menacme (99) ignorado [] menopa

10. PRIMEIRA RELAÇÃO (idade) (99) ignorado [] prim_rel

11. PARCEIROS (número) (100) incontáveis (99) ignorado [] num_par

12. GESTAÇÕES (número) (99) ignorado [] gesta

13. PARTOS (número)	(99) ignorado	[] parto
14. ABORTOS (número)	(99) ignorado	[] aborto
15. ANTICONCEPCIONAL ORAL não (1) sim-atual (2) sim-passado (99) ign.		[] aco
16. ETILISMO (0) não (1) sim-atual (2) sim-passado (99) ign		[] álcool
17. TABAGISMO (0) não(1) sim-atual (2) sim-passado (99) ign		[] tabaco
18. PESO no pré-operatório (kg) (99) ignorado		[] peso
19. ALTURA no pré-operatório (cm) (99) ignorado		[] altura
20. DATA DO HEMOGRAMA		[] hmg_data
21. HEMOGLOBINA (g %)	(99) ignorado	[] hb
22. LEUCÓCITOS (n°)	(99) ignorado	[] leuco
23. NEUTRÓFILOS (%)	(99) ignorado	[] neutro
24. BASTÕES (%)	(99) ignorado	[] bastão
25. EOSINÓFILOS (%)	(99) ignorado	[] eosino
26. LINFÓCITOS (%)	(99) ignorado	[] linfocito
27. LINFÓCITOS ATÍPICOS (%)	(99) ignorado	[] atípico
28. MONÓCITOS (%)	(99) ignorado	[] monocito
29. BASÓFILOS (%)	(99) ignorado	[] basófilo
30. PLAQUETAS	(99) ignorado	[] plaqueta

DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO:

31. DIAGNÓSTICO POR (1) biópsia (2) cone (99) ignorado	[] diagnostico
32. ESTADIAMENTO (FIGO) (1) 1 B (2) 2 A	[] estádio

TRATAMENTO:

33. DATA DA CIRURGIA (histerectomia)	[] cirur_dt
34. TIPO DE HISTERECTOMIA (1) nível 1 (2) nível 2 (3) nível 3	[] histere
35. PRESERVAÇÃO DO OVÁRIO (0) não(1) esquerdo (2) direito (3) ambos	[] preserva
36. TEMPO CIRÚRGICO (minutos)	[] cir_temp
37. TRANSFUSÃO PRÉ-OPERATÓRIA (volume – ml)	[] tran_pré
38. TRANSFUSÃO INTRA-OPERATÓRIA (volume – ml)	[] tran_op
39. LINFONODOS PÉLVICOS (na cirurgia)		
(0) sem evidência de metástase (1) metástase macroscópica ressecável		
(2) metástase macroscópica irressecável (99) ignorado	[] ln_pelve
40. LINFONODOS PARA-AÓRTICOS (na cirurgia)		
(0) sem evidência de metástase (1) metástase macroscópica ressecável		
(2) metástase macroscópica irressecável (99) ignorado	[] ln_aorta
41. BRAQUITERAPIA PÓS-OPERATÓRIA (0) não (1) LDR (2) HDR	[] braqui

DOSE DE BRAQUITERAPIA (cGy) [] dose_bra
DATA DE INÍCIO [] ini_braq
DATA DE TÉRMINO [] fim_braq

42. TELETERAPIA PÓS-OPERATÓRIA

(0) não (1) sim [] tele
DOSE DE TELETERAPIA (cGy) [] dose_tel
DATA DE INÍCIO [] ini_tele
DATA DE TÉRMINO [] fim_tele

DADOS ANÁTOMO-PATOLÓGICOS:

43. NÚMERO DO EXAME [] num_ap

44. TIPO HISTOLÓGICO

(1) epidermóide (2) adenocarcinoma (3) adenoescamoso [] histolog
(4) indiferenciado (9) outros (99) ignorado

45. GRAU HISTOLÓGICO (99) ignorado [] grau_his
46. GRAU NUCLEAR (99) ignorado [] grau_nuc
47. ÍNDICE MITÓTICO (99) ignorado [] mitose

48. INVASÃO LINFOVASCULAR

(0) ausente (1) presente (99) ignorado [] linfvasc

49. INVASÃO PERINEURAL

(0) ausente (1) presente (99) ignorado [] neural

50. INFILTRADO INFLAMATÓRIO

(0) não (1) leve (2) moderado [] inflama (3) intenso (9) sim (SE)
(99) ignorado

51. DESMOPLASIA

(0) não (1) leve (2) moderada [] desmopla (3) intensa (9) sim (SE)
(99) ignorado

52. NECROSE

(0) não (1) leve (2) moderada [] necrose (3) intensa (9) sim (SE)
(99) ignorado

53. COILOCITOSE / HPV (no tumor)

(0) não (1) sim (99) ignorado [] coilocit

54. ASPECTO DO TUMOR

(1) exofítico (2) ulcerado (3) ambos (99) ignorado [] macro_ap

55. LOCALIZAÇÃO DO TUMOR

(1) ectocérvix (2) endocérvix (3) ambos (99) ignorado [] local

56. TAMANHO DO TUMOR 1 (cm) (99) ignorado [] taman_1

57. TAMANHO DO TUMOR

2 (1) até 7 mm (2) > 7 mm (99) ignorado [] taman_2

58. PROFUNDIDADE 1 (mm) (99) ignorado [] prof_1

59. PROFUNDIDADE 2 (1) < 5 mm (2) 5 mm (3) > 5mm [] prof_2

60. PROFUNDIDADE 3 (1) 1/3 externo (2) 1/3 médio (3) 1/3 interno [] prof_3

61. PARAMÉTRIO (invasão)

(0) livre (1) unilateral (2) bilateral (99) ignorado [] parâmetro

62. CORPO UTERINO (invasão)

(0) ausente (1) presente (99) ignorado [] corpo

63. MIOMÉTRIO (invasão)

(0) ausente (1) presente (99) ignorado [] miome

64. ENDOMÉTRIO (invasão)

(0) ausente (1) presente (99) ignorado [] endome

65. VAGINA. (comprometimento)

(0) ausente (1) invasivo (2) in situ (9) SE (99) ign [] vagina

66. MARGENS CIRÚRGICAS

(0) livres (1) comprometidas (99) ignorado [] margem

67. LINFONODOS POSITIVOS (número). [] ln_pos

68. LINFONODOS DISSECADOS (número) [] ln_total

69. LATERALIDADE LINF. POSITIVOS

(1) unilateral (2) bilateral (99) ignorado [] ln_bilat

70. TRANSPOSIÇÃO CAPSULAR

(0) não (1) sim (99) ignorado [] cápsula

RECIDIVA:

71. RECIDIVA (0) não (1) sim (99) ignorado [] recidiva

72. PADRÃO HISTOLÓGICO (recidiva)

(0) sem AP (1) invasivo (2) in situ (3) ambos [] hist_rec

(9) Ca sem especificação (99) ignorado

73. PADRÃO DA RECIDIVA.

(1) pélvico (2) à distância (3) ambos (99) ignorado [] pad_rec

74. LOCAL DE RECIDIVA

(1) vagina (11) linfonodo para-aórtico [] r1

(2) paramétrio (12) linfonodo supraclavicular [] r2

(3) reto (13) pulmão [] r3

(4) bexiga (14) cérebro [] r4

(5) pélvico lateral (15) fígado

(6) pélvico central (16) osso

- | | |
|-------------------------|-------------------------------|
| (7) linfonodo pélvico | (17) pele |
| (9) pélvico SE | (18) mediastino |
| (19) linfonodo inguinal | (20) fundo de saco de Douglas |
| (21) peritônio | (39) distante SE |

75. DATA DA RECIDIVA LOCAL [] local_dt
 76. DATA DA RECIDIVA À DISTÂNCIA [] dist_dt

TRATAMENTO DA RECIDIVA:

77. TRATAMENTO (na recidiva)

(1) RXT (2) cirurgia (3) RXT + cirurgia [] trat_rec (4) QT
 (5) RXT + QT (6) Cirurgia + QT (7) Cirurgia + RXT + QT

78. TELETERAPIA (na recidiva)

(0) não (1) sim [] tele_rec
 DOSE DE TELETERAPIA (cGy) [] ds_t_rec
 DATA DE INÍCIO [] ini_t_re
 DATA DE TÉRMINO [] fim_t_re

79. BRAQUITERAPIA (na recidiva)

(0) não (1) LDR (2) HDR [] bra_rec
 DOSE DE BRAQUITERAPIA (cGy) [] ds_b_rec
 DATA DE INÍCIO [] ini_b_re
 DATA DE TÉRMINO [] fim_b_re

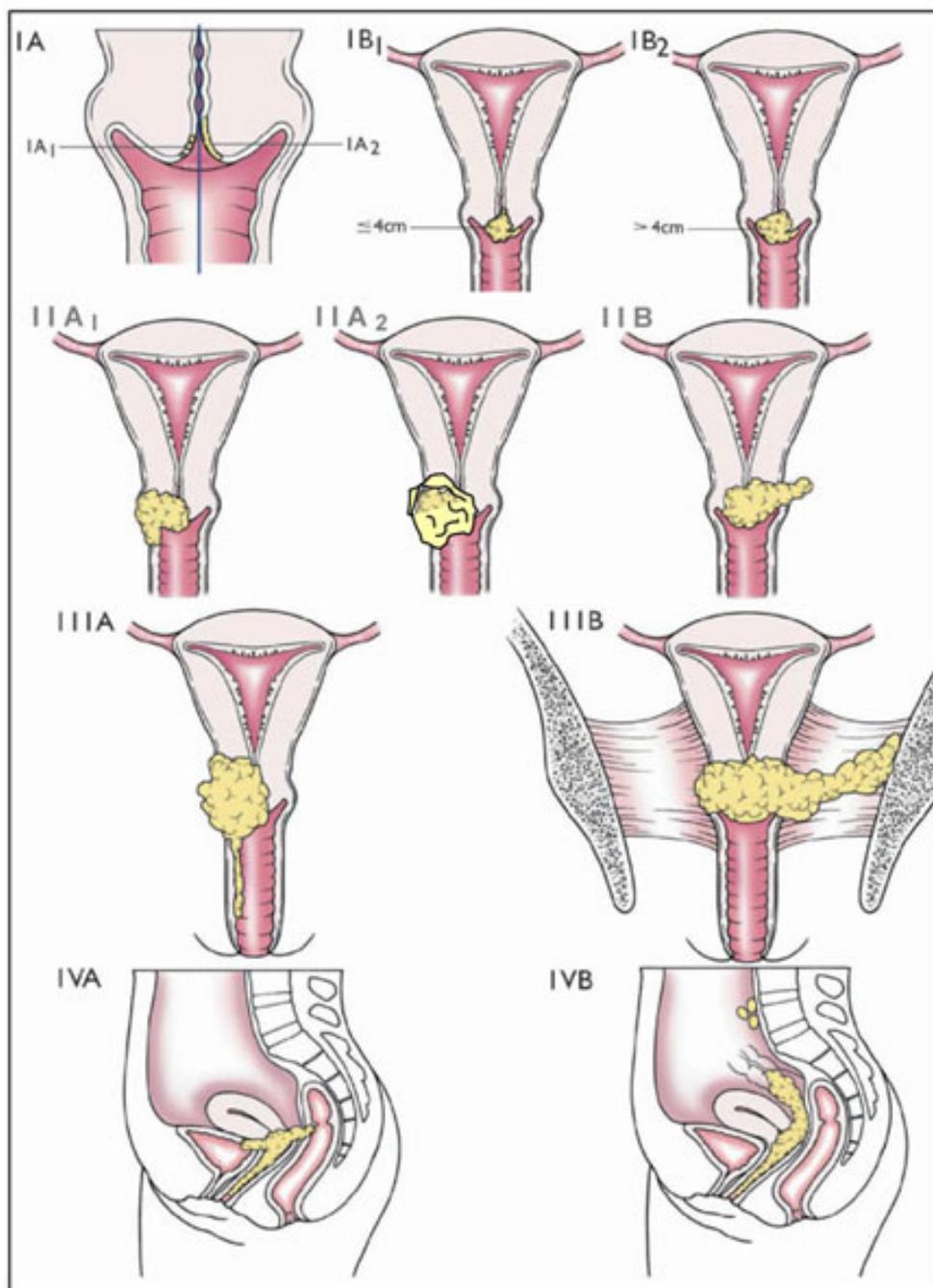
SEGUIMENTO:

80. ÚLTIMA NOTÍCIA

(0) vivo sem câncer (1) vivo com câncer.[] status (10) morte COM câncer
 (12) morte SEM câncer (13) morte por 2º primário (19) morte sem especificação

81. DATA DA ÚLTIMA NOTÍCIA [] status_d

Anexo 4 - Estadiamento do câncer de colo uterino *International Federation of Gynecology and Obstetrics-FIGO*



Fonte: PECORELLI (2009)