



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

JOSÉ ROOSIVELT CAVALCANTE

**IMUNOEXPRESSÃO DA CADERINA-E NAS CERVICITES, NAS
LESÕES INTRAEPITELIAIS ESCAMOSAS E NO CARCINOMA
INVASOR DO COLO UTERINO**

FORTALEZA

2013

JOSÉ ROOSIVELT CAVALCANTE

IMUNOEXPRESSÃO DA CADERINA-E NAS CERVICITES, NAS LESÕES
INTRAEPITELIAIS ESCAMOSAS E NO CARCINOMA INVASOR DO
COLO UTERINO

Dissertação submetida à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em Patologia, da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho
de Almeida (UFC)

Co-orientador: Prof. Dr. José Eleutério Júnior
(UFC)

FORTALEZA
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

C364I Cavalcante, José Roosivelt.
Imunoexpressão da caderina-E nas cervicites, nas lesões intraepiteliais escamosas e no carcinoma invasor do colo uterino / José Roosivelt Cavalcante . – 2013.
75 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Mestrado em Patologia, Fortaleza, 2013.

Área de concentração: Patologia Tropical

Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida

Co-orientador: Prof. Dr. José Eleutério Júnior

1. Caderinas. 2. Neoplasia Intraepitelial Cervical. 3. Cervicite Uterina I. Título.

CDD 616.99466

JOSÉ ROOSIVELT CAVALCANTE

IMUNOEXPRESSÃO DA CADERINA-E NAS CERVICITES, NAS LESÕES
INTRAEPITELIAIS ESCAMOSAS E NO CARCINOMA INVASOR DO COLO UTERINO

Dissertação submetida à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em Patologia, da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre.

Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida (Orientador)
Presidente
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Markus Andret Cavalcante Gifoni
Instituto do Câncer do Ceará (ICC)

Prof. Dr. Francisco Herlânio Costa Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Conceição Aparecida Dornelas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Às minhas pacientes.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida, pelo total apoio à minha decisão de cursar o Mestrado e que, com o seu entusiasmo pelo trato com a Oncologia, me mostrou o fascínio do estudo do microambiente tumoral.

Ao Prof. Dr. José Eleutério Júnior que desde os primeiros contatos na Maternidade Escola Assis Chateaubriand revelou sua empolgação pela pesquisa científica tendo, sem dúvida, influenciado todos nós.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Markus Andret Cavalcante Gifoni, Prof. Dr. Francisco Herlânio Costa Carvalho e a Prof^a. Dr^a. Conceição Aparecida Dornelas por terem concordado em enriquecer este trabalho com seus conhecimentos e experiências.

Ao grande e inseparável companheiro de Mestrado, João Paulo Aguiar Sampaio, valiosa amizade, com quem tanto pude contar nesta caminhada.

Aos colegas, estudantes de Medicina da Universidade Federal do Ceará, João Tarcísio Alves Maia Filho e Renato Braga Vieira pela inestimável participação na laboriosa e insalubre seleção das peças para a pesquisa.

Ao Biólogo Alceu Machado de Sousa pela perícia e precisão na microtomia e à Susana Moreira de Souza pela competente e criteriosa execução do procedimento imunohistoquímico.

Aos servidores do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Cássia Lilian Soares de Almeida, Francisco José Oliveira de Queiroz, Francisca Maria da Conceição Pereira, Igor Chalderst Gomes da Silva, José Saliésio de Moraes Freitas, Luiz Duarte de Menezes, Maria de Fátima Maia de Andrade Lima, Mila Maria Teixeira Aragão, Paula da Paz Palácio, Rejane Mary Sousa da Silva, Sandra Glícia Queiroz e Valéria Cordeiro de Oliveira que tanto colaboraram para a concretização deste projeto.

À valorosa orientação e correção das Bibliotecárias, Norma de Carvalho Linhares e Rosane Maria Costa, da Biblioteca de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará onde este texto foi iniciado e começou a tomar um sentido.

“Nenhum de nós é tão inteligente
quanto todos nós juntos”

Provérbio japonês

RESUMO

O câncer do colo do útero é um dos mais preocupantes problemas de saúde pública do planeta. São esperados para 2013, no Brasil, 17.540 casos novos. Acredita-se atualmente que a maior parte dos cânceres cervicais se desenvolve a partir das neoplasias intraepiteliais cervicais. A aquisição de propriedades invasivas dos tumores malignos está associada ao desequilíbrio nas adesões intercelulares. As moléculas de adesão têm papel fundamental nestas uniões e a caderina-E é uma das mais importantes. Está comprovada a sua presença na membrana celular de tecidos epiteliais normais e foi demonstrado que esta proteína tem sua expressão diminuída na maioria dos tumores sólidos, o que favorece o processo de invasão. O objetivo, neste estudo, foi investigar a imunopresença da caderina-E nas Cervicites, nas Lesões Intraepiteliais Escamosas (LIE) e no Carcinoma Invasivo do colo uterino. A amostra consistiu de 83 casos de biópsias e cones de colo do útero obtidos dos arquivos do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, em 2007 e 2010, com os seguintes diagnósticos: Cervicite = 8 casos; Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LIEBG) = 24 casos; Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (LIEAG) = 28 casos; Carcinoma Invasor = 23 casos. A imunohistoquímica (IHQ) foi efetuada com o anticorpo monoclonal anti-caderina-E, tendo sido considerada positiva a presença de expressão membranar, e negativa, a ausência de expressão. O teste exato de Fisher foi utilizado para os cálculos das tabelas de contingências. Os resultados da imunomarcagem foram: Cervicites = 1/8 (12%) negativos e 7/8 (88%) casos positivos para caderina-E; LIEBG = 7/24 (29%) casos negativos e 17/24 (71%) positivos; LIEAG = 7/28 (25%) negativos e 21/28 (75%) positivos; Carcinoma Invasor = 19/23 (83%) negativos e 4/23 (17%) positivos. A expressão negativa foi muito mais frequente nas LIEs (27%), comparadas com as Cervicites (12%) apesar de diferença não significativa ($p = 0,6657$). Nas LIEs, uma maior perda da caderina-E foi notada nas células menos diferenciadas do 1/3 basal da espessura epitelial. Finalmente, observou-se que a ausência de expressão membranar da caderina-E foi muito mais frequente no carcinoma epidermóide invasor do que nas lesões intraepiteliais escamosas do colo do útero. Estes dados mostraram a importância da caderina-E na carcinogênese do colo uterino, no entanto, muitos aspectos permanecem sem explicação e novos estudos são necessários.

Palavras-chave: Caderina-E. Imunohistoquímica. Cervicites. Lesões intraepiteliais escamosas cervicais. Carcinoma invasor do colo uterino.

ABSTRACT

Cervical cancer is one of the most important public health problems around the world. About 17.540 new cases are expected, in Brazil, for 2013. Actually, it's believed that the majority of cervical cancers begin with non invasive dysplastic lesions, the cervical intraepithelial neoplasias. The acquisition of invasive properties, in epithelial malignancies, is associated to the disruption of intercellular adhesions. The adhesion molecules play a pivotal role in these intercellular bindings and E-cadherin is considered one of the most important among them. In normal epithelial tissues its presence in cell membrane is recognized and it was shown that a down regulation of these proteins in the majority of solid tumors may contribute to facilitate the invasive process. The aim, of this research, was to investigate the E-cadherin immunoexpression in cervicitis, in SILs and in the invasive carcinomas of the uterine cervix. Samples specimens consisted of 83 cases of uterine cervical biopsies and conizations retrieved from the Department of Pathology and Forensic Medicine files of the Federal University of Ceará (Brazil) in 2007 and 2010, distributed, by diagnostic, as follows: Cervicitis = 8 cases; Low Squamous Intraepithelial Lesion (LSIL) = 24 cases; High Squamous Intraepithelial Lesion (HSIL) = 28 cases; and Invasive Carcinoma = 23 cases. Immunohistochemistry (IHC) was performed with the anti-E-cadherin monoclonal antibody and it was considered positive the membranar expression, and, negative, the absence of membranar expression. The Fisher's exact test was the choice for the contingency tables calculations. The immunostaining results were: Cervicitis = (12%) negative and 7/8 (88%) positive cases to E-cadherin; LSILs = 7/24 (29%) negative cases and 17/24 (71%) positive; HSILs = 7/28 (25%) negative and 21/28 (75%) positive; Invasive Carcinoma = 19/23 (83%) negative and 4/23 (17%) positive. The negative expression was much more frequent in SILs (27%) when compared to cervicitis (12%), although no significant difference ($p = 0,6657$). In SILs, a bigger E-cadherin loss was noted in undifferentiated cells at the basal third of epithelial thickness. Finally it was shown that the absence of E-cadherin membranar expression was much more frequent in the uterine cervix invasive carcinoma when compared to LSILs and HSILs. These data showed the E-cadherin importance in cervical carcinogenesis, nonetheless, several aspects remain without explication and new researches are to be performed.

Key words: E-Cadherin. Immunohistochemistry. Cervicitis. Squamous Intraepithelial Lesions. Invasive Carcinoma of the uterine cervix.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imunoexpressão de caderina-E no apêndice cecal (I).....	39
Figura 2 - Imunoexpressão de caderina-E no apêndice cecal (II).....	39
Figura 3 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso de revestimento do colo uterino epitélio normal adjacente a cervicite (a).....	41
Figura 4 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso do colo uterino - epitélio normal adjacente à cervicite (b).....	43
Figura 5 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso de revestimento do colo uterino - LIEBG.....	44
Figura 6 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso de revestimento do colo uterino - LIEBG (expressão apenas no 1/3 intermediário).....	45
Figura 7 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso de revestimento do colo uterino - área normal adjacente à LIEBG.....	45
Figura 8 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso de revestimento do colo uterino - LIEAG.....	47
Figura 9 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso de revestimento de colo uterino - LIEAG (expressão apenas no 1/3 intermediário).....	47
Figura 10 - Imunoexpressão de caderina-E no Carcinoma Invasor do colo uterino e na cervicite.....	48
Figura 11 - Imunoexpressão de caderina-E no Carcinoma Invasor do colo uterino e na LIEBG.....	49
Figura 12 - Imunoexpressão de caderina-E no Carcinoma Invasor do colo uterino e na LIEAG.....	49
Figura 13 - Imunoexpressão de caderina-E na Cervicite, LIEBG, LIEAG e no Carcinoma Invasor do colo uterino.....	50
Figura 14 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso de colo uterino - Carcinoma Invasor.....	51
Figura 15 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso do colo uterino - Carcinoma Invasor (detalhe).....	51
Figura 16 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso do colo uterino - Carcinoma Invasor com LIEAG contígua.....	52
Figura 17 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso do colo uterino - Carcinoma Invasor com LIEAG contígua (detalhe).....	52

Figura 18 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso do colo uterino - Carcinoma Invasor (detalhe de células agrupadas invasivas).....	53
Figura 19 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso do colo uterino - Carcinoma invasor (ninhos infiltrantes).....	53
Figura 20 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso do colo uterino (grupos de células agrupadas invasivas com o estroma de permeio).....	54
Figura 21 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso do colo uterino - Carcinoma invasor (nítida perda de expressão na margem de invasão).....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Imunoexpressão da Caderina-E nas Cervicites, Lesões Intraepiteliais Escamosas e Carcinoma Invasor do colo uterino.....	40
Tabela 2 - Imunoexpressão da Caderina-E no epitélio normal adjacente a Cervicite, LIEBG e LIEAG.....	40
Tabela 3 – Imunoexpressão da Caderina-E em Cervicites por região histológica e na espessura epitelial.....	42
Tabela 4 - Imunoexpressão da Caderina-E na Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LIEBG) por região histológica e na espessura epitelial.....	43
Tabela 5 – Imunoexpressão da Caderina-E na Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (LIEAG) por região histológica e na espessura epitelial.....	46
Tabela 6 – Imunoexpressão da Caderina-E no Carcinoma Invasor do Colo Uterino.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Caderina	<i>Calcium-dependent adherence protein</i>
E1	<i>Early region 1</i> (Oncogene do HPV)
E2	<i>Early region 2</i> (Oncogene do HPV)
E5	<i>Early region 5</i> (Oncogene do HPV)
E6	<i>Early region 6</i> (Oncogene do HPV)
E7	<i>Early region 7</i> (Oncogene do HPV)
HIV	<i>Human Immunodeficiency virus</i>
HPV	<i>Human Papilloma Virus</i> (Vírus do Papiloma Humano)
HSV	<i>Herpes simplex vírus</i>
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
IHQ	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JEC	Junção escamo-colunar
L1	<i>Late region 1</i> (Oncogene do HPV)
L2	<i>Late region 2</i> (Oncogene do HPV)
LAST	<i>The Lower Anogenital Squamous Terminology</i>
LIEAG	Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau
LIEBG	Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau
LIEs	Lesões Intraepiteliais Escamosas
MEC	Matriz extra-celular
MMP	Metaloproteinase
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
p53	Proteína 53 (proteína de peso molecular = 53 kDa)
pRb	Proteína do retinoblastoma
TEM	Transição epitelial-mesenquimal
TME	Transição mesenquimal-epitelial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Câncer do colo uterino: aspectos epidemiológicos.....	13
1.2	Fatores etiopatogenéticos: o papel do papilomavírus humano (HPV) na patogênese do câncer cervical.....	13
1.3	Carcinogênese no colo uterino.....	17
1.3.1	Lesões potencialmente cancerosas de baixo grau e de alto grau.....	18
1.3.2	Carcinoma invasor de células escamosas.....	20
1.4	Transição Epitelial-Mesenquimal.....	22
1.4.1	Conceito.....	22
1.4.2	Moléculas de adesão e Microambiente tumoral.....	24
1.5	Caderina-E e a Transição Epitelial-Mesenquimal.....	31
2	OBJETIVOS.....	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1	Casuística e material utilizados.....	36
3.2	Imunohistoquímica.....	36
3.3	Avaliação da imunoexpressão da caderina-E.....	38
3.4	Avaliação intra e inter-observadores.....	38
3.5	Análise estatística.....	38
3.6	Aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa com seres humanos.....	38
4	RESULTADOS.....	39
5	DISCUSSÃO.....	55
6	CONCLUSÕES.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64
	APÊNDICE.....	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de colo uterino: aspectos epidemiológicos

O câncer do colo do útero é, sem dúvida, um dos mais preocupantes problemas de saúde pública no mundo. As estimativas globais mais recentes indicam o elevado número de 529 mil casos novos para o ano de 2008. Neste mesmo período, este tumor foi responsável pela morte de 275 mil mulheres em todo o planeta. Sendo o aparecimento desta doença muito relacionado ao baixo nível de desenvolvimento e de condições sanitárias, sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos segundo o Instituto Nacional do Câncer do Brasil (INCA). É bem possível que este fato encontre explicação nas falhas dos sistemas de prevenção precoce do câncer e de lesões pré-cancerosas, com programas inadequados e ineficientes. Sem isto, muito poderia ser feito já que, com exceção do tumor de pele não melanoma, o câncer de colo uterino é o que apresenta o maior potencial de prevenção e cura quando diagnosticado precocemente. Este câncer, em geral, começa a se manifestar a partir de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir o pico na faixa de 50 a 60 anos (GLOBOCAN, 2008; INCA, 2012).

No Brasil, as estimativas para 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e apontam a ocorrência de 17.540 casos novos, o que indica um risco estimado de 17 casos por cada 100 mil mulheres e a principal maneira de rastreamento e controle deste tipo de câncer é o método de Papanicolaou convencional por ser de menor custo. Nas mulheres, à parte os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo útero é o mais incidente na região Norte (24/100 mil). Nas regiões Centro-Oeste (28/100 mil) e Nordeste (18/100 mil) ocupa a segunda posição mais frequente, antecedido apenas pelo câncer de mama. Na região Sudeste (15/100 mil), a terceira, e na região Sul (14/100 mil), a quarta posição. No Ceará, estima-se o aparecimento de 850 casos novos para 2012/2013 sendo 270 casos só na Capital (INCA, 2012).

1.2 Fatores etiopatogênicos: o papel do papilomavírus humano (HPV) na patogênese do câncer cervical

Desde que o médico alemão Harald zur Hausen, em 1983, demonstrou o papel do HPV na gênese do câncer cervical ao identificar o DNA do HPV 16 em carcinomas cervicais, a infecção pelo papilomavírus humano ficou reconhecida mundialmente como sendo o

principal fator de risco para o desenvolvimento das lesões precursoras do câncer do colo do útero. Comparativamente, a associação de causa e efeito que se pode fazer entre o HPV e o câncer cervical é superior àquela entre o tabagismo e o câncer pulmonar e, também, mais significativa do que a hepatite B no câncer hepático (DURST *et al.*, 1983; LIBRA *et al.*, 2009; FRANCO, 1995; FRANCO; HARPER, 2005; CARTER; DING; ROSE, 2011).

Os HPVs genitais foram divididos em dois grupos: os de baixo risco oncogênico, encontrados principalmente nas verrugas genitais e os de alto risco oncogênico, associados ao câncer cervical invasor (MUÑOZ *et al.*, 2003; CARCOPINO *et al.*, 2011). Nenhum deles é particularmente virulento no sentido de, diretamente, causar a morte do hospedeiro. Talvez por que este vírus seja vulnerável a vigorosas respostas imunológicas, a maior parte destas infecções regride no período de um ano e, geralmente, são as infecções por HPV de baixo risco que desaparecem mais rapidamente (ORLANDO *et al.*, 2012).

É atualmente reconhecido que virtualmente todos os cânceres cervicais estão relacionados a infecções por um dos 14 tipos considerados de alto risco ou oncogênicos (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68), dentre estes, os mais comuns são o HPV 16 e o HPV 18 (MEIJER; SNIJDERS; CASTLE, 2006; MAGALDI *et al.*, 2012). Segundo Walboomers *et al.*, a prevalência mundial do HPV no carcinoma cervical chega aos 99,7% fazendo-a a mais alta fração até então informada no mundo, atribuível a uma causa específica de um tão importante câncer humano (WALBOOMERS *et al.*, 1999; ZHOU *et al.*, 2012).

Os papilomavírus têm um genoma circular em dupla-fita e tamanho aproximado de 8 kb e, não obstante tão pequenos, têm uma biologia muito complexa. Sucintamente, possui três oncogenes, E5, E6 e E7 que modulam os processos de transformação; duas proteínas reguladoras, E1 e E2 responsáveis pela transcrição e replicação e duas proteínas estruturais, L1 e L2 que compõem o capsídio viral (De VILLIERS *et al.*, 2004). Os oncogenes virais E6 e E7 têm sido considerados como os principais iniciadores do câncer cervical induzido pelo HPV, muito provavelmente por propiciarem a integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira. A expressão destas duas oncoproteínas é fundamental para a manutenção da evolução maligna das células cancerosas cervicais, principalmente por inibirem os genes supressores tumorais p53¹ e retinoblastoma (pRb). O gene E6 interage com o p53 e o E7 liga-se a pRb assim bloqueando a ação destes supressores tumorais (NARISAWA-SAITO; KIYONO, 2007; zur HAUSEN, 2002).

¹ p53, pRb – proteínas supressoras tumorais (MALUMBRES, 2011; BUITRAGO-PÉREZ *et al.*, 2009).

O processo de transmissão do HPV torna-se facilitado quando da existência de zonas de abrasão ou maceração de superfícies epiteliais (zur HAUSEN, 1996). O ciclo do HPV está muito relacionado à biologia da célula hospedeira e seus virions inicialmente infectam as camadas basais do epitélio provavelmente através de micro-traumas e penetram na célula via interação com certos receptores como a integrina α -6 para o HPV 16 (NARISAWA-SAITO; KIYONO, 2007). Os alvos primários do HPV no epitélio escamoso são os queratinócitos e a infecção crônica destes está associada com o desenvolvimento do câncer cervical (GIANNINI *et al.*, 2002; GOVINDAPPAGARI; SCHIAVONE; WRIGHT, 2011).

A principal via de transmissão é o contato sexual e, de fato, o DNA do HPV é raramente detectado em jovens mulheres sem experiência sexual. Tais fatos permitem o estabelecimento de correlação entre o número de parceiros e a prevalência das infecções por este vírus. Esta infecção pode ser transmitida digitalmente de um local para outro. Eventualmente, fômites também podem ser incriminados, assim como o instrumental médico. Contato oral-genital pode levar a infecção de sítios orais por HPV anogenital (zur HAUSEN, 1996).

Em testemunho, a história da medicina já registrava a notável clarividência do médico italiano Rigoni-Stern que em 1842, após analisar certificados de óbitos do período 1760-1839, na cidade de Verona, observou a elevada frequência de câncer cervical em mulheres casadas, viúvas e prostitutas enquanto de rara ocorrência em virgens e freiras, podendo concluir que o aparecimento deste tipo de câncer poderia estar relacionado ao contato sexual (RIGONI-STERM, 1842; ADEGBOYEGA, 2012).

Sendo endêmica e facilmente transmissível a infecção pelo HPV tem seu pico cedo, logo nos primeiros anos que se seguem à iniciação dos intercursos sexuais. Sabe-se que a causa central do câncer cervical é a infecção persistente por tipos de HPV carcinogênicos, contudo a grande maioria das infecções nas mulheres jovens desaparece rapidamente num período de 6 a 12 meses a partir do momento da detecção. A taxa de novas infecções diminui com a idade (RODRIGUEZ *et al.*, 2010).

A infecção pelo HPV é uma condição necessária, mas não por si só suficiente para o estabelecimento e evolução da doença. Eventos adicionais genéticos e epigenéticos são presumivelmente necessários para alterar os fatores celulares (NARISAWA-SAITO, 2007). Na realidade, o câncer cervical é apenas uma rara complicação de uma infecção por HPV de alto risco e requer várias condições adicionais cumulativas uma vez que a infecção se torne

evidente. Isto está particularmente exemplificado pelo fato de infecções pelo HPV serem muito comuns nas mulheres jovens, mas frequentemente regredirem espontaneamente.

O risco para se contrair HPV é estimado em 80% e pelo menos 80% das infecções por HPV de alto risco parecem transitórias, nem mesmo dando início a NIC. Porque certas infecções tendem a persistir e outras não, ainda é questionável, mas variações interindividuais na capacidade de fazer regredir a infecção através de efetiva resposta imunológica podem ser uma explicação (SNIJDERS *et al.*, 2006; BASEMAN; KOUTSKY, 2005; MEIJER; SNIJDERS; VAN DEN BRULE, 2000; VAZQUEZ-MENA *et al.*, 2012). Com efeito, a disparidade entre as taxas de infecção pelo HPV e o desenvolvimento de neoplasia e carcinoma sugerem a presença de outros elementos predispondo à transformação maligna (THOMISON; THOMAS; SHROYER, 2008).

Muitos outros fatores de risco têm sido demonstrados por influenciarem a patogênese do carcinoma de colo, como início precoce de vida sexual, multiparidade, gravidez, imunossupressão, tabagismo, parceiros múltiplos. Também é bem estabelecido como fator de risco o modo de contracepção, ou seja, o não uso de preservativo e utilização a longo termo de contracepção oral. Igualmente, a infecção pelo HIV reduz a habilidade do sistema imunológico de lutar contra a infecção, incluindo o HPV, aumentando a possibilidade de células pré-cancerosas evoluírem para um câncer. Outros cofatores são também citados tais como a infecção pelo vírus do herpes simples (HSV) ou pela bactéria *Chlamydia trachomatis*, além de fatores nutricionais e dietéticos (LIBRA *et al.*, 2009; CARTER; DING; ROSE, 2011).

O papel da imunidade intrínseca no controle da infecção pelo HPV e o subsequente desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas é mostrado indiretamente pelo aumento da frequência de lesões associadas ao HPV em pacientes com imunidade celular deprimida (GIANNINI *et al.*, 2002). Como se pode observar, há aspectos relacionados ao próprio vírus como tipo, carga viral, infecção única ou múltipla além de outros fatores ligados à imunidade, genética e até ao comportamento, tudo podendo interferir para regressão ou persistência da infecção e progressão para as lesões precursoras e câncer (INCA, 2012).

As vacinas contra o HPV surgem como importantes ferramentas no combate a este câncer porem ainda estão fora do alcance das populações de baixa renda em razão do seu elevado custo. É necessário registrar que as vacinas disponíveis no mundo, atualmente, têm como alvo apenas os tipos de HPV 16 e 18, do grupo de alto risco oncogênico. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) do Brasil tem nos seus registros duas vacinas, a

quadrivalente (para os tipos de HPV 6, 11, 16 e 18)² e a bivalente (para os tipos de HPV 16 e 18) com indicação de aplicação em mulheres de 9 a 26 anos. Espera-se para um futuro próximo a inclusão desta vacina no Programa Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde (INCA, 2012).

1.3 Carcinogênese no colo uterino

Entre os cânceres cervicais, o carcinoma escamoso é o mais frequente com o expressivo percentual de 80% contra apenas 20% dos adenocarcinomas (LEE; SHEN, 2012) e seu sítio inicial, em mais de 90% dos casos, é o revestimento do colo, no ponto de encontro do epitélio escamoso da ectocérvice com o epitélio colunar da endocérvice, denominado junção escamocolunar (JEC). A JEC é um referencial em citologia e colposcopia e é considerada altamente susceptível à infecção pelo HPV constituindo, realmente, o lugar onde mais de 90% das neoplasias do trato genital inferior se iniciam. E, principalmente, sendo a infecção longa e persistente por HPV do grupo de alto risco oncogênico, esta pode caminhar para a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) tida como precursora do câncer cervical.

Apesar de atingir altas taxas de incidência, a infecção por HPV regride, mesmo sem tratamento, na maior parte dos indivíduos infectados. De fato, verifica-se que o aumento da expressão das proteínas E6 e E7 acompanha apenas um pequeno número de casos podendo-se, assim, especular que a integração do DNA viral à célula hospedeira seja um evento muito raro (NARISAWA-SAITO, KIYONO, 2007). A maior parte das infecções torna-se indetectável no período de um a dois anos o que nos conduz à reflexão de que o vírus do papiloma humano, como único fator, não é o suficiente para causar o câncer cervical (KOSHIOL *et al.*, 2008).

A carcinogênese humana tem sido caracterizada como uma doença relacionada à instabilidade genômica, circunstância necessária para habilitar células tumorais a adquirirem alterações genéticas que favoreçam a sobrevivência e expansão clonal num microambiente de rápida mudança em um neoplasma emergente. Evidências de instabilidade genômica são sempre observadas nas lesões iniciais associadas aos HPV de alto risco oncogênico, em particular, as mitoses tripolares são fortemente indicativas na distinção de uma lesão positiva para HPVs oncogênicos. As oncoproteínas E6 e E7 do HPV podem, independentemente, induzir instabilidade genômica em células humanas normais favorecendo a formação de

² Os tipos de HPV 6 e HPV 11 não constam da lista dos oncogênicos mas são responsáveis por mais de 90% das verrugas ano-genitais (zur HAUSEN, 1996; de VILLIERS *et al.*, 2004; GRAVITT, 2011).

defeitos mitóticos e aneuploidia por meio de indução de anormalidades do centrosoma que são a causa das mitoses multipolares nas lesões cervicais. Por outro lado, os oncogenes E6 e E7 dos HPV de baixo risco oncogênico não são capazes de induzir anormalidades do centrosoma não ocasionando, assim, a instabilidade genômica. As atividades de transformação dos HPV de alto risco assinalam a consequência de uma estratégia de replicação viral em razão da necessidade de replicação do genoma viral nas células epiteliais suprabasais assim garantindo sua permanência neste tecido de ciclo rápido quando evolui para maturação e descamação (CAHILL *et al.*, 1999; KLAUSNER, 2002; MÜNGER *et al.*, 2004; HAGA *et al.*, 2008).

A NIC I (displasia leve) e NIC II (displasia moderada) têm uma expressão de E6 e E7 relativamente baixa com replicação episomal do genoma viral, ao passo que NIC III (displasia acentuada, carcinoma *in situ*) e o câncer invasivo mostram uma elevada expressão destas oncoproteínas e, na maioria das vezes, com integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira, por meio do que se acredita ser iniciado o desenvolvimento neoplásico (DOEBERITZ, 2002; NARISAWA-SAITO; KIYONO, 2007).

1.3.1 Lesões potencialmente cancerosas de baixo grau e de alto grau

As designações baixo grau e alto grau são, de fato, as mais recentes e foram adotadas por patologistas a partir do Projeto "Estandarização da Terminologia do Epitélio Escamoso do Trato Ano-Genital Inferior para Lesões Associadas ao HPV" (The L. A. S. T. Project - The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions) para alinhar e unificar as terminologias com a Classificação do Sistema Bethesda (1988 revisada em 2001) favorecendo a comunicação científica global e com o grande ganho de melhorar o manejo com o paciente (KOSS, 1990; SOLOMON *et al.*, 2002; APGAR; ZOSCHNICK; WRIGHT JUNIOR, 2003; DARRAGH *et al.*, 2012; WAXMAN *et al.*, 2012). No entanto, a nomenclatura das lesões pré-cancerosas do epitélio escamoso do colo do útero já contava com duas classificações histológicas anteriores: A Classificação de Displasias e a Classificação de Neoplasia Intraepitelial Cervical – NIC (REAGAN, 1953; RICHART, 1967; RENDÓN, 2008).

Reagan (1953) usou o termo displasia, ao que atribuiu três níveis diferentes, em acordo com o grau de comprometimento da espessura do epitélio escamoso por células atípicas. Chamou de displasia leve aquela em que apenas o terço mais profundo do epitélio era composto de células basalóides anormais; de displasia moderada para os casos em que as

anomalias das células indiferenciadas ocupavam os dois terços inferiores do epitélio e, displasia severa (acentuada), quando mais de dois terços da espessura do epitélio escamoso continham células indiferenciadas anormais havendo, no entanto, certo grau de estratificação e maturação remanescentes. Para Reagan, apenas o carcinoma *in situ* correspondia ao acometimento da totalidade da espessura epitelial por células indiferenciadas atípicas (REAGAN; SEIDEMANN; SARACUSA, 1953).

Já Richart (1967) por defender que estas lesões representam na verdade um *continuum* no desenvolvimento da malignidade, ou seja, são estágios sucessivos na patogênese do câncer cervical, denominou-as coletivamente de neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) com graus I, II e III (RICHART, 1967; KIVIAT, 1996). O grau da NIC é normalmente atribuído em conformidade com a proporção da espessura epitelial ocupada por células neoplásticas indiferenciadas do tipo basalóide. A NIC I correspondendo à displasia leve; a NIC II, equivalente à displasia moderada e a NIC III abrangendo tanto a displasia acentuada como o carcinoma *in situ* (BUCKLEY; BUTLER; FOX, 1982).

A atual terminologia alinhada com a do Sistema de Bethesda engloba, nas lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LIEBG), as alterações celulares associadas ao HPV e a displasia leve ou NIC I. Por sua vez, a lesão intraepitelial escamosa de alto grau (LIEAG) abrange a displasia moderada ou NIC II, a displasia acentuada ou NIC III e ainda o carcinoma *in situ* (KOSS, 1990; SOLOMON *et al.*, 2002; APGAR; ZOSCHNICK; WRIGHT JUNIOR, 2003; DARRAGH *et al.*, 2012; WAXMAN *et al.*, 2012).

Nos nossos dias, os estudos e pesquisas científicas indicam que a maior parte dos cânceres cervicais se desenvolve a partir de lesões displásticas não invasivas, as neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) (SNIJDERS *et al.*, 2006; THOMISON; THOMAS; SHROYER, 2008; OZAKI; ZEN; INOUE, 2011). Há 3 categorias de NIC (NIC I, NIC II, NIC III) em conformidade com o grau de displasia e o HPV está intimamente envolvido no desenvolvimento e progressão destas lesões. A histologia é o padrão ouro para o diagnóstico das NIC. As NIC II e NIC III apresentam um substancial risco de progressão para o câncer invasivo. Por outro lado, cerca de 80% das NIC I regridem de forma espontânea (OZAKI; ZEN; INOUE, 2011). Esta tendência vem apoiar a ideia de que a NIC I representa uma infecção ativa e sobretudo transitória tendo altas taxas de ocorrência e regressão entre as mulheres de vida sexual ativa (KOSHIOL *et al.*, 2008).

Estudos prospectivos realizados em população adulta com diagnóstico de NIC I demonstraram que o risco de progressão para NIC II ou mais, após um período de 2 anos é de 10%. Nas adolescentes, a taxa de regressão é extremamente alta, maior que 90% e o

percentual de progressão é estimado em 3% (GUIDO, 2008; MOSCICKI *et al.*, 2004; GUIDO *et al.*, 2003). As infecções que persistem são aquelas que têm risco maior de progressão para a principal lesão precursora do câncer (NIC III) e tudo parece indicar que são estas que poderão, após alguns anos, evoluir para o carcinoma cervical caso permaneçam sem tratamento (GRAVITT, 2011; ZHOU *et al.*, 2012). Em média, são necessários 10 a 15 anos para que uma infecção persistente possa originar, via estágios pré-malignos consecutivos, um carcinoma cervical evidente. Isto vem apoiar a ideia de que a carcinogênese induzida pelo HPV é um processo de várias etapas (SNIJDERS *et al.*, 2006; VAZQUEZ-MENA *et al.*, 2012).

Um ponto biológico de interrupção parece existir entre as lesões de baixo e de alto graus em termos de status e resultado da infecção. As lesões de baixo grau têm maior propensão de regredir enquanto as de alto grau tendem a persistir ou progredir. Estas tendências podem estar relacionadas a cada uma das diferentes variedades do HPV podendo-se supor que aquelas infecções advindas através dos grupos de HPV de alto risco oncogênicos seriam as que, mais provavelmente, evoluiriam (THOMISON III; THOMAS; SHROYER, 2008). Todos os tipos de HPV (alto risco e baixo risco) causam lesões de baixo grau da cérvix uterina enquanto a maioria das lesões cervicais classificadas como de alto grau, carcinoma *in situ* ou câncer invasivo, são positivas para os tipos oncogênicos de HPV. As lesões de baixo grau tendem a se localizar mais distalmente em relação ao orifício externo cervical, ao passo que a tendência das de alto grau, é a localização mais proximal ao orifício externo do colo uterino. A lesão de baixo grau pode se iniciar primeiro ou ao mesmo tempo em que a de alto grau ou na ausência desta última (BASEMAN; KOUTSKY, 2005).

1.3.2 Carcinoma invasor de células escamosas

O carcinoma cervical inicia-se através da infecção por HPV de alto risco como os tipos 16 e 18 (MAGALDI *et al.*, 2012). Geralmente detectado em mulheres multíparas nos anos iniciais da pós-menopausa (FRANCO; HARPER, 2005). Em países em desenvolvimento, este tipo de câncer é diagnosticado já em estado avançado em mais de 80% das mulheres. Diferentemente de outros tumores ginecológicos, é clinicamente estagiado e os fatores de prognóstico incluem o estágio clínico no momento do diagnóstico, tamanho do tumor, invasão linfo-vascular e envolvimento de paramétrios e linfonodos (SOONTHORNTHUM *et al.*, 2011).

Estes neoplasmas são complexas estruturas que, para obter capacidade de crescimento e invasão, interagem com ambiente no seu entorno, também chamado de microambiente tumoral. Através desta interação promovem suprimento sanguíneo, bloqueiam sinais negativos de crescimento, concomitantemente aumentando os sinais positivos, desenvolvem resistência a apoptose e incrementam a replicação ilimitada de células (HAMMES et al., 2007; LORUSSO; RÜEGG, 2008).

Já está bem estabelecido que interações entre as células tumorais e o tecido hospedeiro têm papel importante na determinação de como ou se uma dada neoplasia poderá se desenvolver. Na maioria dos casos, células tumorais utilizam as funções das células estromais que, em última instância, vão agir conforme a sinalização tumoral assim demonstrando que o microambiente tumoral desempenha um determinante papel no desenvolvimento do câncer. Pode-se então especular que células do tecido hospedeiro não são circunstantes passivos no crescimento do tumor, mas participantes ativos na promoção da propagação neoplástica através do organismo. Sempre que as células carcinomatosas ultrapassam a barreira natural constituída pela membrana basal, elas, pela primeira vez, entram em contato físico direto com o tecido estromal do hospedeiro. A extensão do que virá a seguir dependerá em parte das propriedades biológicas das células tumorais e, em parte, da composição do estroma invadido. No entanto, células tumorais, invariavelmente, causam reações estromais cujas, natureza e amplitude dependem do tipo de tumor e variedades de traços individuais (LE BITOUX; STAMENKOVIC, 2008). Células tumorais são tipicamente caracterizadas pela resistência a apoptose o que lhes possibilita a proliferação contínua e imortalidade para sobreviver sob estímulos de crescimento anormais (ZHOU *et al.*, 2012).

O câncer cervical proporciona um bom modelo para o estudo dos processos metastáticos em razão do passo a passo na sua evolução. O espectro completo da progressão do câncer cervical envolve cérvix normal, neoplasias intraepiteliais, carcinoma *in situ*, câncer invasivo local e as lesões metastáticas distantes. Na sua evolução, células cancerosas podem invadir o sistema linfático e se espalhar até linfonodos distantes em torno de veias na parede pélvica. Entre todas as etapas, esta disseminação é a causa primária da falha no tratamento e subsequente morte de pacientes com este tipo de câncer. Entender as sinalizações relacionadas à plasticidade celular nas múltiplas etapas da progressão do carcinoma é um aspecto importante na abordagem desta neoplasia. Sabe-se que a ocorrência de invasão e metástase é a causa maior de morte na maioria destes cânceres (SZALMÁS; KÓNYA, 2009; LEE; SHEN, 2012). De fato, as metástases são responsáveis por 90% das mortes por câncer (BOGENRIEDER; HERLYN, 2003).

Durante a progressão metastática células epiteliais tumorais polarizadas adquirem características invasivas e migratórias, deixam o sítio primário, invadem a membrana basal, fazem intravasão nos vasos sanguíneos ou linfáticos, são transportadas pela circulação, extravasam da circulação, se disseminam no sítio secundário e crescem no foco metastático. Esta disseminação tanto pode acontecer em grupamentos celulares como por migração ameboide, não proteolítica, de células únicas em movimento do tipo mesenquimal. Esta conversão fenotípica habilita as células tumorais a se dissociarem do tecido original para formarem metástases em órgãos distantes. A plasticidade das células epiteliais, provocada pela quebra da homeostasia celular levando à progressão maligna tem sido associada com a perda de traços epiteliais e aquisição de fenótipo migratório. No carcinoma, as células que iniciam o evento de transição mesenquimal, tornam-se móveis e aumentam a habilidade de invasão. Por conseguinte, a transição do fenótipo epitelial para mesenquimal, representa um mecanismo importante na maleabilidade da célula epitelial e no processo metastático (LEE *et al.*, 2008; LEE; SHEN, 2012).

1.4 Transição Epitelial-Mesenquimal

1.4.1 Conceito

A transição epitelial-mesenquimal (TEM) é um processo essencial desde o desenvolvimento embrionário e amplamente reutilizado em adultos para muitos processos tais como cicatrização de feridas, regeneração de tecidos, fibrose de órgãos e também na progressão do câncer. A maior parte dos tecidos e órgãos em adultos tem origem numa sequência de conversões de fenótipo epitelial para mesenquimal, via TEM, ou de seu inverso, mudando de mesenquimal para epitelial, através da transição mesenquimal-epitelial (TME) (KALLURI, 2009; THIERY *et al.*, 2009). A TEM é reconhecida pelo seu mecanismo atuante na dispersão de células embrionárias, também na formação de fibroblastos em tecidos lesados e como participante no comportamento invasivo e metastático das células cancerosas (KALLURI, 2009).

A totalidade das células do nosso corpo origina-se de uma só célula. Suas variantes fenotípicas são resultado da expressão de um transcriptoma específico que facilita posteriores diversidades funcionais. Por ocasião da embriogênese o epitélio é altamente plástico e apto para ir e voltar de um fenótipo para outro, ou seja, do epitelial para

mesenquimal através dos processos de TEM ou seu reverso, via transição mesenquimal-epitelial (TME), quando muda do fenótipo mesenquimal para o epitelial (KALLURI, 2009).

Os eventos primários de transição epitelial-mesenquimal (aqueles que ocorrem em tecidos nunca antes submetidos a estes processos) têm lugar durante a implantação do embrião dentro do útero, por ocasião da gastrulação, e durante a formação da crista neural nos amniotas. No caso da implantação do embrião, células específicas da área extra-embriônica sofrem a transição epitelial-mesenquimal (TEM). Exemplo disto é quando células extravilosas trofo-ectodérmicas assim o fazem para infiltrar o endométrio e ancorar na placenta. No embrião propriamente dito, a primeira ocorrência de transição epitelial-mesenquimal se dá por ocasião da gastrulação (PIJNENBORG *et al.*, 1980; ACLOQUE *et al.*, 2009).

Nos vertebrados, os tecidos têm dois fenótipos básicos, o epitelial e o mesenquimal. O epitélio é o tipo mais antigo de tecido formado por camadas de células estacionárias fortemente aderidas umas as outras e com uma polaridade apical-basal. Muitos tipos de junções evoluíram neste epitélio porém a mais importante junção aderente é estabelecida pela Caderina-E (Cad de *calcium-dependent* e E de *epithelial*). Trata-se, então, de uma molécula de adesão envolvida nas interações homotípicas cálcio-dependentes, para formar as junções de aderência. A estreita ligação das faces laterais destas células confere aos tecidos subjacentes uma adequada proteção contra organismos invasores. Estas camadas de células contíguas são firmemente ancoradas sobre uma matriz extracelular que contém colágeno tipo IV e laminina compondo a lâmina basal ou membrana basal. Em condições normais, elas não destacam nem se movem a partir dos seus agrupamentos. Por outro lado, as células mesenquimais não formam camadas organizadas, não têm uma arrumação apical basolateral nem polarização. São fusiformes, dispersas, não aderidas umas às outras e móveis (HAY, 2005; THIERY; SLEEMAN, 2006; WU; ZHOU, 2008; LEE; SHEN, 2012).

A transição epitelial-mesenquimal (TEM) pode ser traduzida pela total perda do fenótipo epitelial para o mesenquimal seguida pela aquisição de características mesenquimais. Células com este fenótipo são extremamente móveis e invasivas. Trata-se, assim, de um processo biológico que possibilita que uma célula epitelial polarizada, que normalmente interage com a membrana basal através do seu polo basal, assumo um fenótipo mesenquimal com ganho na capacidade migratória e de invasão. A conclusão do processo de TEM é sinalizada pela degradação da lâmina basal subjacente e formação da célula mesenquimal que com a aquisição de mobilidade poderá migrar a partir da camada epitelial onde foi originada (HAY, 2005; KALLURI; WEINBERG, 2009; MICALIZZI; FARABAUGH; FORD, 2010).

1.4.2 Moléculas de adesão e Microambiente tumoral

Nos tecidos, as células têm que aderir de forma apropriada não somente umas às outras, mas também aos componentes da matriz extracelular (MEC) que as circundam (PARSONS; HORWITZ; SCHWARTZ, 2010; VALASTYAN; WEINBERG, 2011). Este papel é desempenhado pelas moléculas de adesão, fundamentais no estabelecimento da estrutura normal dos tecidos e no seu funcionamento, propiciando ligações físicas e assim favorecendo a montagem de estruturas teciduais complexas. As moléculas de adesão são proteínas de superfície que estão envolvidas em muitas funções como conexão celular, diferenciação celular, morfogênese, embriogênese, organogênese, crescimento, sinalização entre células e ambiente, atividades imunológicas, função citotóxica, cicatrização de feridas, inflamação e no desenvolvimento de tumores (MAKRILIA *et al.*, 2009; CABRIJAN; LIPOZENCIC, 2011).

Dentre elas, há as que estão permanentemente presentes na superfície celular, outras se desenvolvem após estimulação e as que estão presentes por um curto tempo. Com relação à ligação, são homofílicas, quando conectadas a um mesmo ligante e heterofílicas quando conectadas a um ligante diferente; podem ter uma forte ou fraca afinidade pelo ligante. Algumas se ligam ao citoesqueleto e cada uma pode executar diferentes funções. Estas adesões desempenham um papel importante na determinação do destino da célula. Portanto, parece evidente que um transtorno destas interfaces possa contribuir na patogênese de várias doenças humanas incluindo o desenvolvimento do câncer (CABRIJAN; LIPOZENCIC, 2011; VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

Com base em suas características estruturais e funcionais, as moléculas de adesão podem ser divididas em quatro grandes grupos: caderinas, integrinas, selectinas e os membros da superfamília das imunoglobulinas (CABRIJAN; LIPOZENCIC, 2011).

As Caderinas compreendem uma grande família de glicoproteínas transmembranares que medeiam a adesão específica célula-célula através de interações homotípicas – entre moléculas de mesmo tipo - na presença de cálcio extracelular, por isso ditas cálcios-dependentes, funcionando como moléculas-chaves na morfogênese de vários órgãos. Parecem ser as mais importantes já que a inativação de outras moléculas de adesão apresenta pouco efeito na biologia celular, estando as caderinas com sua expressão normal. A superfamília de caderinas consiste de caderinas clássicas, que são os principais mediadores das adesões célula-célula cálcio-dependentes, as caderinas não clássicas, incluindo caderinas desmossomais e as recentemente descobertas proto-caderinas. De acordo com a origem, são

denominadas E (epitelial), P (placentar), M (muscular) e N (neural) e as desmossomais. Entre as mais estudadas estão a caderina-E, encontrada nas células epiteliais, caderina-N, encontrada nos nervos e a caderina-P, na placenta e que pertencem a subfamília das caderinas clássicas (Van ROY; BERX, 2008; MAKRILIA *et al.*, 2009; CABRIJAN; LIPOZENCIC, 2011).

Integrinas são moléculas de superfície celular envolvidas na adesão da célula à matriz extracelular (MEC) circundante, fisicamente se ligando a esta última e conduzindo sinais para o crescimento celular, apoptose, divisão celular e migração de leucócitos na inflamação. Presentes em todas as células, estas glicoproteínas são as maiores mediadoras dos contatos entre a célula e a matriz extracelular (MEC).

Selectinas são moléculas de adesão de superfície celular importantes para a migração de leucócitos. São também glicoproteínas e efetoras da adesão transitória célula-célula na vasculatura durante processo inflamatório, permitindo aos leucócitos reconhecerem os sítios de extravasamento, onde eles aderem para, em seguida, migrar através da barreira endotelial.

A superfamília das imunoglobulinas é composta de moléculas de adesão cujas porções extracelulares contêm um ou mais domínios de imunoglobulinas, que são características dos anticorpos. São expressas em uma grande variedade de tipos celulares como células do sistema nervoso, leucócitos, células epiteliais e endoteliais e medeiam tanto as adesões homofílicas célula-célula quanto as adesões heterotípicas. Têm papéis importantes nos mecanismos imunológicos e inflamatórios e não são dependentes de íons de cálcio (MAKRILIA *et al.*, 2009; CABRIJAN; LIPOZENCIC, 2011; VALASTYAN; WEINBERG, 2011; ZHONG; RESCORLA, 2012).

Estas moléculas são, em sua maioria, tipicamente proteínas trans-membrana, compostas de três domínios: um domínio extracelular responsável pela fixação do ligante; um domínio transmembranar e a cauda citoplasmática fixada ao cito-esqueleto de actina. Elas têm funções não somente mecânicas entre célula-célula e célula-MEC, mas também controlam outros importantes aspectos envolvendo o comportamento da célula (REN; ROBERTS; SHI, 2011; ZHONG; RESCORLA, 2012).

Reconhecidas atualmente por mediar muito mais do que a adesão entre células e entre células e a matriz extracelular (MEC), mudanças na sua expressão têm sido associadas com alterações no status de sinalização ou de adesão de células tumorais, habilitando-as a adquirir um fenótipo mais móvel e invasivo. Estes fatos tornaram as moléculas de adesão foco de grande investigação, sendo o interesse voltado para a possibilidade de exploração clínica

usando-as como biomarcadores na avaliação de prognóstico ou, ainda, como alvo terapêutico em doenças malignas (MAKRILIA *et al.*, 2009; GIBSON, 2011).

São cada vez mais consistentes as evidências sugerindo que alterações nas propriedades das células neoplásicas podem desempenhar um papel central no desenvolvimento e progressão do fenótipo maligno. De fato, mudanças na expressão ou função das moléculas de adesão influenciam não somente o status de adesão como, também, o de transdução de sinal das células e participam em processos essenciais para a invasão e metástase do tumor (MAKRILIA *et al.*, 2009).

A disseminação metastática das células tumorais é a causa maior de morbidade e mortalidade em pacientes com câncer considerando que isto determina a transição de uma doença localizada potencialmente curável para um status generalizado e geralmente incurável da neoplasia. Desta forma, a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à progressão tumoral, invasão local e a formação de metástases representam um dos grandes desafios na pesquisa exploratória do câncer. Já há muito tempo é reconhecida a importância das mudanças na adesão das células tumorais para o desenvolvimento do câncer. A observação que células malignas tumorais podem deixar o tumor primário para se disseminar em órgãos distantes e que células tumorais mostram notáveis mudanças em sua interação com os componentes da matriz extracelular (MEC) conduziram à noção que mudanças na adesão célula-célula e célula-matriz coincidem com a progressão do tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2000; CAVALLARO; CHRISTOFORI, 2004; MAKRILIA *et al.*, 2009).

A metástase tumoral é considerada um processo de múltiplas etapas, caracterizada por um alto grau de complexidade. Mais especificamente, a cascata metastática consiste de vários passos, incluindo destacamento das células tumorais do sítio primário, invasão da matriz extracelular (MEC), intravasão na corrente sanguínea, disseminação através da circulação, extravasão e colonização em órgão alvos distantes e formação de lesões secundárias. Em seguida à extravasão e invasão no sítio secundário, a sobrevivência e proliferação das células tumorais podem ser influenciadas pelas interações célula-célula e célula-MEC no nicho metastático. Uma das mais proeminentes características neste processo é a alteração nas propriedades de adesão das células neoplásicas mediadas por mudanças na expressão das moléculas de adesão (MAKRILIA *et al.*, 2009; PSAILA; LYDEN, 2009).

Mesmo que as bases genéticas da tumorigênese possam variar muito entre os diferentes tipos de câncer, as etapas celular e molecular necessárias para a metástase são geralmente semelhantes para todos os tipos de tumores sólidos (BOGENRIEDER; HERLYN, 2003).

Resultados de experiências recentes indicam que, tal como na mediação intercelular e na interação célula-MEC, as moléculas de adesão também diretamente modulam o sinal de transdução. Portanto, mudanças na expressão ou função destas moléculas podem contribuir para a progressão do tumor tanto alterando o status de adesão da célula como afetando a sua sinalização. Moléculas de adesão de várias classes e funções tanto podem interagir como modular várias vias de sinalização. Por outro lado, moléculas de sinalização podem diretamente afetar a função das moléculas de adesão, levando a mudanças nas interações célula-célula e célula-MEC (CAVALLARO; CHRISTOFORI, 2004).

O estudo das interações entre o tumor e o tecido circundante, ou microambiente, é de grande ajuda na compreensão dos eventos precoces que conduzem à progressão tumoral (ARIZTIA *et al.*, 2006). É com este ambiente no seu entorno que os tumores interagem para obter capacidade de crescimento e invasão (HAMMES *et al.*, 2007; LORUSSO; RÜEGG, 2008). O microambiente, também chamado nicho, assume um importante papel no desenvolvimento do câncer. O principal componente do nicho é a matriz extracelular (MEC) que é uma complexa rede de macromoléculas com distintas propriedades bioquímicas, físicas e biomecânicas. A MEC é composta de grande número de componentes bioquímicos distintos incluindo proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos e polisacárides com diferentes propriedades físicas e bioquímicas (LU; WEAVER; WERB, 2012; ÖZBEK *et al.*, 2010).

Do ponto de vista estrutural, estes componentes formam tanto a membrana basal (que é produzida conjuntamente por células epiteliais, endoteliais e estromais para separar o epitélio ou endotélio do estroma) quanto a matriz intersticial que é primariamente constituída por células do estroma. A membrana basal é uma MEC especializada, sendo mais compacta e menos porosa do que a matriz intersticial e tem uma composição distinta compreendendo o colágeno tipo IV, lamininas, fibronectinas e proteínas de ligação que conectam os colágenos com outros componentes proteicos. Por outro lado, a matriz intersticial é rica em colágenos fibrilares, proteoglicanos e várias glicoproteínas tornando-se, assim, bastante carregada, hidratada, contribuindo enormemente para a resistência à tensão nos tecidos (EGEBLAD; RASCH; WEAVER, 2010; LU; WEAVER; WERB, 2012).

Muito embora rigidamente controlada durante o desenvolvimento embrionário e na homeostase dos órgãos, a MEC desregula-se e torna-se desorganizada em doenças como, por exemplo, o câncer. Desta forma, influencia diretamente a progressão do câncer promovendo a transformação celular e metástase. Estas anomalias da MEC igualmente desregulam o comportamento das células estromais, facilita a angiogênese associada ao tumor

conduzindo, assim, a geração de um microambiente tumorigênico (LU; WEAVER; WERB, 2012).

O conceito de que microambientes locais ou nichos desempenham importante papel na regulação do comportamento da célula, que é um dos temas centrais na embriologia clássica, tem se tornado cada vez mais aceito na biologia do câncer. Esforços têm sido direcionados para determinar como os componentes do nicho podem iniciar o desenvolvimento do câncer. Neste aspecto, estudos recentes têm destacado a importância dos componentes não celulares do nicho, em especial a MEC durante a progressão tumoral (LU; WEAVER; WERB, 2012).

A MEC é um componente não celular essencial no nicho das células-tronco em um adulto onde tem papéis múltiplos. Por exemplo, receptores da MEC possibilitam a ancoragem num local preciso do microambiente onde as propriedades das células-tronco podem ser mantidas. Fisicamente, esta ancoragem faz com que células-tronco estabeleçam contato direto com as células do nicho que produzem moléculas de sinalização parácrina, essenciais para a manutenção das propriedades das células-tronco. Ao mesmo tempo, favorece a manutenção da polaridade celular (frequentemente inexistente no câncer), orienta os fusos mitóticos e possibilita a divisão celular assimétrica, mecanismo fundamental, pois, acredita-se ser através dele que acontece a auto-renovação das células-tronco assim como a sua diferenciação (LU; WEAVER; WERB, 2012).

Assim, a MEC, através de suas potentes habilidades de sinalização, não só mantém as propriedades das células-tronco como pode regular a diferenciação delas, muito embora ainda não sejam bem conhecidos os detalhes de como tal acontece. Inúmeras vias de sinalização, essenciais na biologia destas células, em numerosos modelos de sistema, são objetos de modulação pela MEC e o instante que determina sua expansão e diferenciação, é muito delicado e deve ser firmemente controlado durante a homeostase normal e função dos órgãos. Um desequilíbrio entre estes dois eventos pode levar à geração de células iniciadoras do tumor, que têm sido denominadas células-tronco do câncer, seja pela exagerada expansão da população destas, ou por uma falha em sua diferenciação (LU; WEAVER; WERB, 2012).

As células-tronco do câncer constituem uma minoria das células tumorais aptas a originarem um novo tumor e são encontradas no nicho onde moléculas de adesão são componentes essenciais. O nicho controla a auto-renovação e diferenciação das células-tronco adultas. Uma expressão diminuída de certas moléculas de adesão pode levar a mudanças no comportamento da adesão e da mobilidade das células-tronco (MAKRILIA *et al.*, 2009).

Assim, os papéis fundamentais desempenhados pela MEC, a tornam forte e provável alvo de ser responsável pela criação de um nicho de células malignas por ocasião da transformação celular. É até possível, pelo menos em teoria, que uma dinâmica desregulada da MEC pode ser a origem da formação de uma linhagem anormal específica da própria MEC que possa conduzir a uma super expansão e perda de diferenciação das células-tronco. Todavia, tais hipóteses precisam ainda ser muito testadas até serem tidas como verdades científicas (LU; WEAVER; WERB, 2012).

Um distúrbio funcional da MEC pode comprometer a membrana basal na sua condição de barreira física assim como promover a transição epitelial-mesenquimal (TEM) e, conjuntamente, podem facilitar a invasão dos tecidos por células cancerosas. Uma maneira de remoção da membrana basal, pelo menos parcialmente, acontece através da super-expressão das metaloproteinases (MMPs). É razoável predizer que células cancerosas e seu cortejo estromal e de células do sistema imunológico contendo MMPs, tenham vantagens seletivas sobre as células normais já que, presumivelmente, aquelas, podem prontamente entrar e sair através da membrana basal do endotélio e metastatizar sítios distantes (LU; WEAVER; WERB, 2012).

E, ainda, mudanças na topografia da MEC podem também facilitar a migração das células tumorais. A linearização e o espessamento das fibras de colágeno são achados comuns em cânceres e são frequentemente encontrados em áreas onde a invasão ativa do tecido tumoral e de sua vasculatura são observadas, sugerindo que desempenham papel ativo na facilitação da invasão das células do câncer. Estudos utilizando imagens vivas, realmente, têm mostrado que as células malignas migram rapidamente pelas fibras de colágeno em áreas enriquecidas com esta proteína (LU; WEAVER; WERB, 2012).

A desregulação da dinâmica da MEC pode facilitar a desdiferenciação celular e a expansão das células-tronco cancerosas e, ainda, desequilibra a polaridade dos tecidos e promove a invasão. Como consequência, as células epiteliais são, de forma direta, afetadas por este desequilíbrio levando à transformação e à metástase (LU; WEAVER; WERB, 2012).

Para que células tumorais disseminadas possam iniciar lesões metastáticas, devem evadir de numerosos sinais de morte celular que são induzidos pela perda de adesão às células vizinhas e à MEC, e, também necessitam sobreviver na circulação e se comunicar com o estroma do sítio estranho, o sítio alvo (PSAILA; LYDEN, 2009). Então, dependendo do tipo de câncer e do órgão de destino, estas etapas podem ter diferentes cinéticas durante o processo de metástase (LU; WEAVER; WERB, 2012).

Para se completar, uma metástase requer não somente um nicho local para prover o crescimento das células cancerosas no tumor inicial como, também, necessita do sítio metastático que propiciará sobrevivência às células invasoras e subsequente colonização e expansão para formar as macrometástases. Muito embora ainda em seu começo, estudos dão consistente embasamento de que a MEC, assim como no nicho do tumor primário, é um componente essencial no microambiente metastático (LU; WEAVER; WERB, 2012).

O câncer, atualmente, é visto como doença heterogênea, não somente no sentido de que diferentes etiologias podem justificar o mesmo resultado clínico, mas, também, que muitos outros tipos de células - juntando-se às células cancerosas e componentes não celulares - precisam ser mobilizados e coordenados para dar suporte a sobrevivência, crescimento e invasão das células malignas. A matriz extracelular (MEC) surge como um dos integrantes fundamentais do nicho local nos vários estágios do processo carcinogênico (LU; WEAVER; WERB, 2012).

São crescentes as evidências de que o microambiente tumoral desempenha um papel chave no desenvolvimento do câncer. Células do tecido hospedeiro são participantes ativos na promoção da propagação neoplástica através do organismo (LE BITOUX; STAMENKOVIC, 2008).

Os tumores, antes vistos como estruturas constituídas exclusivamente de células malignas, são atualmente considerados como estruturas complexas contendo não somente células transformadas, mas também tipos de células normais da circunvizinhança. Este microambiente tumoral é um espaço físico e funcional que inclui células tumorais, células normais, matriz extracelular (MEC), fibroblastos estromais, células do sistema imunológico e células vasculares e ainda fornece um meio para interagirem (ARIZTIA *et al.*, 2006).

Conceitualmente, o aparecimento das primeiras células tumorais induz a mudanças na homeostase normal dos tecidos; estas interações com o microambiente acontecem por meio de várias vias, incluindo o contato direto célula-célula e o contato célula-MEC. A ativação do estroma hospedeiro por células tumorais estimula a inter-sinalização heterotípica entre diversas células de origem epitelial e mesenquimal; estas interações são necessárias para proliferação, invasão e metástase (ARIZTIA *et al.*, 2006; LITTLEPAGE; EGEBLAD; WERB, 2005).

As moléculas de adesão têm despertado o interesse dos cientistas para o uso como marcadores no diagnóstico do câncer. Há uma expectativa de que pesquisas através da imunohistoquímica possam ajudar no estabelecimento de modelos para a gradação dos tumores, especialmente quando os critérios histológicos são controversos ou quando

resultados não podem ser reproduzidos. A conscientização da importância do papel destas moléculas nas doenças neoplásicas é cada vez maior e isto poderá favorecer o aparecimento de maiores oportunidades para aplicações terapêuticas (MAKRILIA *et al.*, 2009).

1.5 Caderina-E e a Transição Epitelial-Mesenquimal (TEM)

Entre as várias proteínas responsáveis pela adesão intercelular, uma das mais estudadas e presentes em virtualmente todos os tipos de células epiteliais é a caderina-E que regula a organização dos tecidos e influencia o desenvolvimento e metástases do câncer. A perda da expressão de caderina-E está associada com a desdiferenciação, aumento do potencial de invasão e metastático e constitui um importante passo no desenvolvimento da maioria, senão de todos os tipos, dos tumores de origem epitelial. Seus níveis de expressão são frequentemente, inversamente correlacionados com o grau e estágio do tumor (ROWLANDS *et al.*, 2000; SHIMAZUI *et al.*, 2006; LINDSTRÖM *et al.*, 2007; BAUM; SETTLEMAN; QUINLAN, 2008; WU; ZHOU, 2008; KATTO; MAHLKNECHT, 2011; VALASTYAN, WEINBERG, 2011).

A caderina-E é essencial para a manutenção da arquitetura tecidual tanto no adulto como no embrião. Por outro lado, esta proteína encontra-se desregulada na maioria dos tumores malignos de origem epitelial. Um achado convincente associando a caderina-E e câncer é a observação de que o bloqueio desta molécula é suficiente para desencadear a TEM nos mamíferos. De fato, Behrens *et al.*, (1989), demonstraram que as células epiteliais adquirem características invasivas que se manifestam a partir da perda da adesão mediada pela caderina-E (HAY, 2005). A falência em caderina-E é um evento fundamental no contexto da TEM e, portanto, uma etapa crítica na progressão do câncer já que favorece a disseminação hematogênica e linfогênica das células tumorais. Estas observações levaram à denominação de supressor tumoral para a caderina-E. Assim, atribui-se que a perda da caderina-E em tumores esteja associada com prognósticos clínicos pobres (THIERY, 2002; JODELE *et al.*, 2006; BAUM; SETTLEMAN; QUINLAN, 2008; KATTO; MAHLKNECHT, 2011).

Fortes correlações têm sido identificadas entre os padrões de expressão de moléculas de adesão como a caderina-E ou integrinas em associação com prognóstico clínico de pacientes com câncer. Tumores sólidos e menos invasivos geralmente expressam níveis mais altos da caderina-E quando comparados com neoplasias difusas e invasivas. Portanto, estas moléculas de adesão podem ser usadas como marcadores com o objetivo de avaliar o

potencial metastático em pacientes com câncer. Tais achados também sinalizam para outro aspecto: se o desequilíbrio da caderina-E relaciona-se a mudanças epigenéticas, isto pode se tornar um alvo para estratégias terapêuticas (KATTO; MAHLKNECHT, 2011).

Nas junções aderentes funcionais, o domínio extracelular da caderina-E interage com moléculas de caderina-E da superfície das células vizinhas. O domínio citoplasmático da caderina-E é o sítio de interação com as moléculas de catenina, que são as mediadoras da ligação com o cito-esqueleto. Alterações de proteínas envolvidas no complexo caderina-E-catenina são eventos precoces no desenvolvimento do câncer. Estes incluem redução ou perda de expressão de caderina-E, induzida por eventos genéticos e epigenéticos (mutação ou reduzida transcrição de genes) redistribuição de caderina-E para diferentes sítios na célula, disseminação da caderina-E e competição por sítios de ligação de outras proteínas. Realmente, a reconstituição do complexo funcional de adesão da caderina-E suprime o fenótipo invasivo de inúmeros diferentes tipos de tumor (BOGENRIEDER; HERLYN, 2003).

Uma característica dos carcinomas humanos é a adesão defeituosa célula-célula e célula-matriz. A diminuição ou perda da expressão da caderina-E é comum em muitas doenças malignas humanas incluindo o câncer cervical. Mutações de genes da caderina-E têm sido identificadas numa proporção significativa de cânceres de colo uterino. Em adenocarcinomas de colo uterino, a expressão diminuída de β -catenina mostrou-se como fator independente na predição de resultados limitados de sobrevida. Por outro lado, a diminuição da expressão de α -catenina tem sido encontrada nos carcinomas cervicais. E, ainda, outros estudos indicam que o nível de caderina-E está envolvido na diferenciação em tumores de cabeça e pescoço, e que expressões elevadas de caderina-E são frequentemente associadas com melhores resultados clínicos (Al MOUSTAFA *et al.*, 2008).

Experimentos utilizados para silenciar a expressão da caderina-E não somente mostraram mudança morfológica de um fenótipo epitelial para um tipo fibroblastóide, característica da TEM, mas também mostraram concomitante exacerbação no comportamento invasivo celular. A perda da caderina-E tem sido considerada causa de aumento na disseminação celular e na metástase tumoral (NATALWALA; SPYCHAL; TSELEPIS, 2008).

Enquanto os sinais e moléculas que estão envolvidos na formação dos complexos de adesão mediados pela caderina-E têm sido extensivamente estudado, outros desencadeados pela perda de função da caderina-E durante o desenvolvimento e progressão do câncer estão sendo elucidados. A observação que a diminuição da função da caderina-E na maioria dos tipos de células epiteliais resulta em mudança fundamental no fenótipo celular (ou seja, uma

polaridade celular reduzida e aumento nas propriedades migratórias e de crescimento invasivo) indicam que a perda da caderina-E aciona sinais ativos que iniciam a TEM. Considerando as diversas interações da caderina-E e a conexão do complexo citoplasmático ao cito-esqueleto de actina, várias vias potenciais de sinalização podem tomar parte ativa neste processo (CAVALLARO; CHRISTOFORI, 2004).

Uma característica definidora da TEM é a redução dos níveis de caderina-E e concomitante produção de caderina-N (LEE *et al.*, 2006). Acredita-se que esta alternância de expressão possa contribuir para a TEM e para a TME. Estados patológicos da TEM e da TME parecem ser resultado de reativação inapropriada de programas embrionários, gerando tecidos anormais como tumores metastáticos que se mostram refratários a mecanismos de controle. Ao contrário da caderina-E, tida como supressora da invasão, a caderina-N é responsabilizada de desempenhar várias funções nos tumores. Sabe-se que ela promove a sobrevivência celular nos melanomas e nos carcinomas de próstata. Sua introdução nas células do carcinoma de bexiga leva a uma aumentada capacidade de invasão (BAUM; SETTLEMAN; QUINLAN, 2008; HELLNER *et al.*, 2009; ZHAN *et al.*, 2012).

Entre todas as caderinas a “E” e “N” são as mais amplamente distribuídas nos tecidos humanos. A caderina-N é uma proteína pro-migratória normalmente restrita aos tecidos neurais e alguns não neurais como fibroblastos, osteoblastos e ainda células endoteliais, mesoteliais e retiniais. Não são expressas em células epiteliais, mas são detectadas em certos carcinomas onde, provavelmente, estão relacionadas com a promoção da angiogênese e adesão (HELLNER *et al.*, 2009; ZHAN *et al.*, 2012).

Mesmo não sendo ainda muito claro de que forma a expressão e atividade da caderina-N se relacionam com a TEM, atribui-se que ela pode dotar-se de um fenótipo dominante incrementando a mobilidade, invasão e progressão do tumor e sua super-expressão tem sido correlacionada com o aumento da migração, invasão e evolução tumoral (BAUM; SETTLEMAN; QUINLAN, 2008).

Experimentos biofísicos têm sugerido que a interface célula-célula da caderina-N possa ser significativamente menos estável do que a equivalente na caderina-E. No entanto, os fatores que contribuem para as diferenças essenciais entre as caderinas “E” e “N” e o que as habilita a desempenhar papéis distintos no epitélio e no mesênquima não são totalmente compreendidos. Além disso, estas diferenças são provavelmente muito sutis já que há casos nos quais a própria caderina-E torna-se mediadora da migração celular (processo usualmente associado a caderina-N) e outros em que a caderina-N participa na construção epitelial (BAUM; SETTLEMAN; QUINLAN, 2008).

Pesquisas recentes têm indicado que a caderina-N é reexpressada ou aumentada em vários tumores epiteliais humanos e que os oncogenes E6 e E7 do HPV16 podem desencadear sua reexpressão em células epiteliais primárias. A manifestação aberrante desta molécula relaciona-se com mudanças morfológicas na direção de um fenótipo fibroblástico dotando as células de maior mobilidade e capacidade de invasão e metástase. A TEM associada ao câncer geralmente envolve o assim denominado, comutador de caderina, pois, enquanto há baixa expressão de caderina-E, aumenta a expressão da caderina-N. Estas trocas reversíveis no nível de expressão das diferentes caderinas são cada vez mais utilizadas para monitorar a TEM. Assim, a mudança de caderina-E, das células epiteliais, para caderina-N, encontrada tanto nas células mesenquimais como nos fibroblastos, células do câncer e tecido neural, tem sido frequentemente utilizada para acompanhar o progresso da TEM no desenvolvimento do embrião e na progressão do câncer (CHO *et al.*, 2008; HELLNER *et al.*, 2009; ZEISBERG; NEILSON, 2009).

Enquanto muito permanece a ser descoberto sobre os aspectos molecular, celular e mecânico das transições entre os estados, epitelial e mesenquimal, esforços continuados nesta área podem vir a elucidar maneiras através das quais este ciclo de eventos patológicos possa ser utilizado como base para a elaboração de uma futura estratégia terapêutica (BAUM; SETTLEMAN; QUINLAN, 2008).

2 OBJETIVOS

Geral

Avaliar a imunexpressão da Caderina-E nas cervicites, nas lesões intraepiteliais escamosas e no carcinoma invasor do colo uterino

Específicos

- Observar, nas cervicites, imunexpressão da caderina-E na ectocérvice, JEC/metaplasia e segundo a espessura epitelial
- Comparar a expressão de caderina-E nas lesões intraepiteliais escamosas (LIEs) propriamente ditas e na mucosa normal adjacente a estas lesões da cérvice uterina
- Averiguar nas LIEs a imunomarcção da caderina-E nas regiões histológicas ectocérvice e JEC/metaplasia e na espessura epitelial: 1/3 basal, 1/3 intermediário e 1/3 superficial do colo do útero
- Investigar de forma comparativa a imunexpressão da caderina-E, nas lesões intraepiteliais escamosas e no carcinoma de células escamosas invasor do colo uterino
- Avaliar a expressão de caderina-E nas diferentes regiões histológicas dos blocos invasores dos carcinomas de células escamosas cervicais: área central e margem de invasão

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística e materiais utilizados

Este estudo de corte transversal foi elaborado e desenvolvido a partir de 83 casos selecionados de arquivo incluindo biópsias e conizações de colo uterino realizadas na Maternidade Escola Assis Chateaubriand da Universidade Federal do Ceará (MEAC/UFC) nos anos de 2007 e 2010 e com laudos histopatológicos emitidos pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML/UFC).

A distribuição dos casos envolveu quatro grupos contemplando os seguintes diagnósticos histopatológicos: cervicites (08 casos), LIEBG (24), LIEAG (28) e carcinoma invasor (23 casos). Em todos os grupos, foi avaliado o epitélio normal em áreas ou biópsias adjacentes à lesão.

Globalmente, a idade das pacientes esteve compreendida entre 19 e 78 anos. No grupo das cervicites a idade oscilou de 19 a 43 anos (média = 25 anos); nas LIEBGs, de 20 a 43 anos (média = 29 anos); nas LIEAGs, de 19 a 66 anos (média = 35 anos) e, nos carcinomas invasores, o intervalo de idade variou entre 24 e 78 anos (média = 50 anos).

Após revisão das lâminas, foi efetuada a separação dos blocos parafinados correspondentes objetivando os novos cortes ao micrótomo (*Leica Microsystems*). Feitas as secções de 3 µm de espessura e apostas em lâminas silanizadas, para, em seguida, serem submetidas ao procedimento imunohistoquímico.

3.2 Imunohistoquímica

As lâminas silanizadas foram levadas para uma estufa com temperatura estabilizada a 60°C para ali permanecerem por uma hora, com o objetivo de eliminar o excesso de parafina.

Ao mesmo tempo iniciou-se o preparo do módulo de pré-tratamento *Dako PT Link*, que é, de fato, um banho-maria fechado, com temperatura monitorizada e controlada por computador. Seu tanque foi preenchido com 1500 ml da solução tampão resultante da adição de 30 ml do tampão *Envision Flex Target Retrieval Solution - pH=9* (referencia K8000 – *Dako*) a 1470 ml de água destilada. O módulo foi pré-aquecido a 65°C para receber as lâminas.

Ao serem retiradas da estufa, as lâminas foram colocadas no módulo que foi fechado e programado para alcançar e se estabilizar a temperatura de 97°C. Nestas condições o material permaneceu por cerca de 30 minutos, após o que a temperatura declinou, de forma programada, até 65°C. Esta etapa proporcionou, através do calor e da solução tampão, a quebra das ligações induzidas pela formalina recuperando, assim, os epítomos antigênicos. Além disso, promoveu a reidratação dos corte histológicos permitindo melhor penetração dos anticorpos com consequente aumento da acessibilidade aos epítomos. Todo o material foi retirado dos tanques para lavagem por 3 minutos com a solução *Wash Buffer Envision Flex – pH=6 – Dako*.

Em seguida, procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com o peróxido de hidrogênio a 5% durante 10 minutos – esta etapa teve por objetivo evitar a coloração de fundo (*background*). Depois, efetuou-se nova lavagem por 3 minutos. Neste momento, os cortes foram circundados com caneta hidrofóbica para receberem o anticorpo primário (*Monoclonal Mouse Anti-Human E-cadherin – Clone NCH-38*). Efetuada a aplicação do anticorpo primário, lâmina por lâmina, todo o conjunto permaneceu em incubação por aproximadamente 19 horas em geladeira à temperatura de 8°C. Esta longa duração foi utilizada para favorecer a ligação do anticorpo com o antígeno.

Ao serem retiradas, duas lavagens foram realizadas com a solução *Wash Buffer Envision Flex* ; uma depois de 5 minutos e, outra, após mais 3 minutos.

Seguiu-se a incubação com o Linker (*EnVision Flex+, Mouse*) durante 15 minutos (para promover a amplificação da ligação do antígeno com o polímero na etapa a seguir). Depois, foram efetuadas duas lavagens com o tampão *Wash Buffer Envision Flex* à intervalos de 5 minutos.

Procedeu-se, em seguida, à incubação com o polímero Dako EnVision durante 40 minutos. Repetidas duas passagens na solução de lavagem, a intervalos de 5 minutos.

Na sequencia, efetuou-se a incubação do cromógeno *Dako DAB* por 10 minutos para, depois, realizar lavagem das lâminas em água corrente. Em seguida, foi feita a contracoloração com a hematoxilina (*EnVision Flex Hematoxylin*). Depois, realizado novo banho com água corrente.

Nesta fase, foram executadas três passagens em álcool absoluto e três no xilol para obtenção de desidratação e diafanização. Finalmente foi realizada a montagem das lamínulas utilizando-se o Bálsamo do Canadá deixando as lâminas prontas para a leitura ao microscópio.

Todas as sessões do procedimento imunohistoquímico incluíram lâminas para controle positivo e negativo (TAYLOR; 2006). Para o controle positivo, o tecido utilizado foi o apêndice cecal, considerado, em relatos prévios, excelente marcador para a caderina-E (HUNT *et al.*, 1997; JAWHARI *et al.*, 1997). Nos mesmos cortes do apêndice cecal, células dos tecidos não epiteliais (fibroblastos, linfócitos, células endoteliais), que não se coram pela caderina-E, representam o controle negativo da amostra. O controle negativo da reação, com o mesmo material, foi obtido através da não aplicação do anticorpo primário na lâmina.

3.3 Avaliação da imunexpressão da caderina-E

A imunomarcção foi considerada positiva quando da presença da caderina-E membranar, e, negativa, quando da ausência desta molécula na membrana celular, baseada nos critérios de Shimazui *et al.*, 2006 e de Almeida *et al.*, 2010.

3.4 Avaliação intra e inter-observadores

As preparações histológicas da caderina-E deste estudo foram analisadas pelo autor e por um patologista em microscópio Olympus BX41.

3.5 Análise estatística

O aplicativo *GraphPad Prism 5* foi utilizado para os testes estatísticos e na elaboração dos gráficos. O teste exato de Fisher propiciou os cálculos para as tabelas de contingências e o valor de $p < 0,05$ foi definido como estatisticamente significativo.

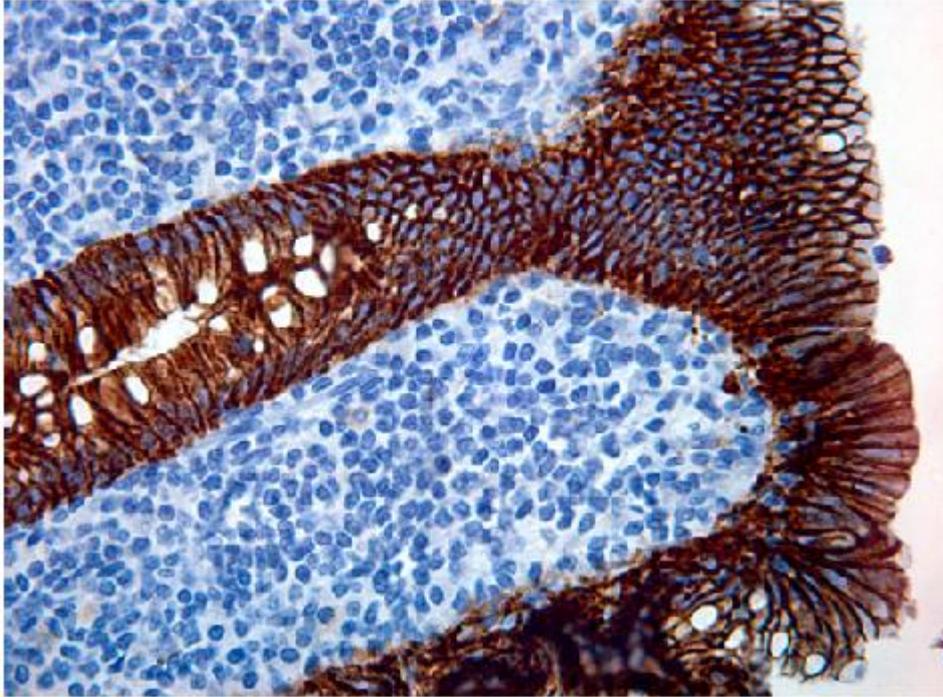
3.6 Aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa com seres humanos

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Escola Assis Chateaubriand da Universidade Federal do Ceará - CEP/MEAC/UFC sob o número de protocolo 91/2011 tendo obtido aprovação em reunião realizada em 30 de novembro de 2011.

4 RESULTADOS

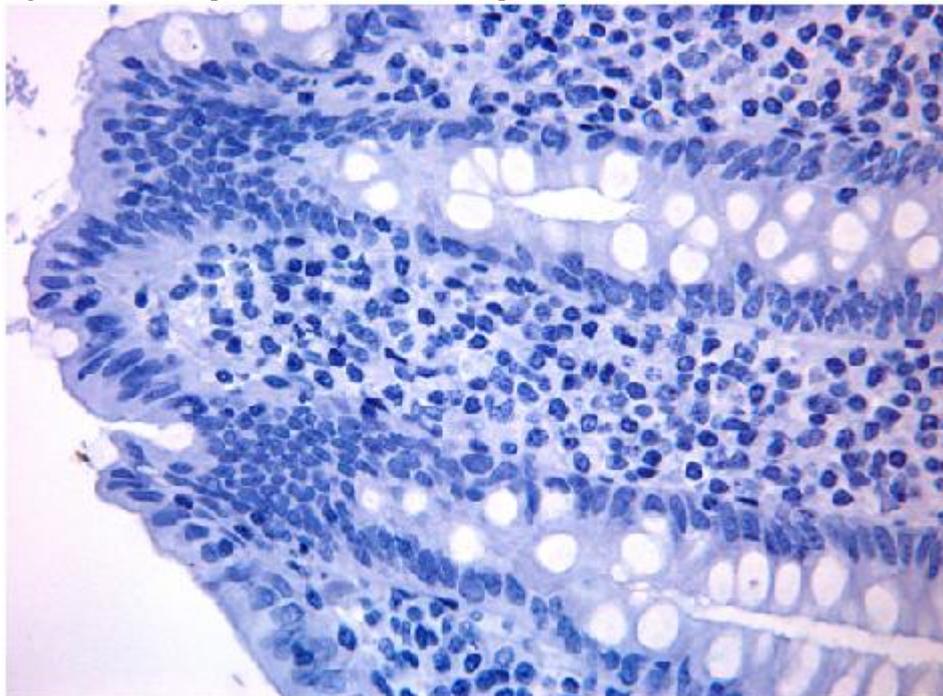
Para facilitar a avaliação dos resultados da amostra, inicialmente são apresentados, nas figuras seguintes, os controles positivo e negativo da reação:

Figura 1 - Imunoexpressão de caderina-E no apêndice cecal (I)



Controle positivo (presença de expressão membranar) - 400X

Figura 2 - Imunoexpressão de caderina-E no apêndice cecal (II)



Controle negativo (ausência de expressão membranar) - 400X

Conforme se pode observar pela Tabela 1, as cervicites e lesões intraepiteliais exibem predomínio acentuado de marcação positiva enquanto nos carcinomas prevalece a expressão negativa da Caderina-E.

Tabela 1 - Imunoexpressão da Caderina-E nas Cervicites, Lesões Intraepiteliais Escamosas e Carcinoma Invasor do colo uterino

LESÃO	Expressão de Caderina-E		TOTAL
	Negativa	Positiva	
Cervicite	1 (12%)	7 (88%)	8
LIEBG	7 (29%)	17 (71%)	24
LIEAG	7 (25%)	21 (75%)	28
Carcinoma Invasor	19 (83%)	4 (17%)	23
TOTAL			83

A Cervicite apresentou 1/8 (12%) de expressão negativa e 7/8 (88%) casos com expressão membranar positiva. A LIEBG teve 7/24 (29%) para marcação negativa e 17/24 (71%) para a expressão positiva. Na LIEAG observou-se 7/28 (25%) casos com marcação negativa e 21/28 (75%) de expressão positiva. Por outro lado o Carcinoma Invasor expressou 19/23 (83%) marcações negativas e apenas 4/23 (17%) casos de expressão positiva.

A tabela 2 mostra a imunoexpressão de caderina-E para as áreas de tecido normal adjacente às Cervicites, LIEBGs e LIEAGs. Nas áreas adjacentes às cervicites, 1/8 casos (12%) tiveram expressão negativa e 7/8 (88%) apresentaram expressão positiva. Na área adjacente às LIEBGs, houve 8/15 (53%) marcações negativas e 7/15 (47%) para expressão positiva. Finalmente, nas LIEAGs, a expressão negativa foi de 6/13 (46%) enquanto em 7/13 (54%) casos, a imunomarcação foi positiva.

Tabela 2 - Imunoexpressão da Caderina-E no epitélio normal adjacente a Cervicite, LIEBG e LIEAG

LOCALIZAÇÃO	Expressão de Caderina-E		TOTAL
	Negativa	Positiva	
Adjacente a Cervicite	1 (12%)	7 (88%)	8
Adjacente a LIEBG	8 (53%)	7 (47%)	15*
Adjacente a LIEAG	6 (46%)	7 (54%)	13**

* Em 9 casos o epitélio normal adjacente às LIEBGs não esteve representado

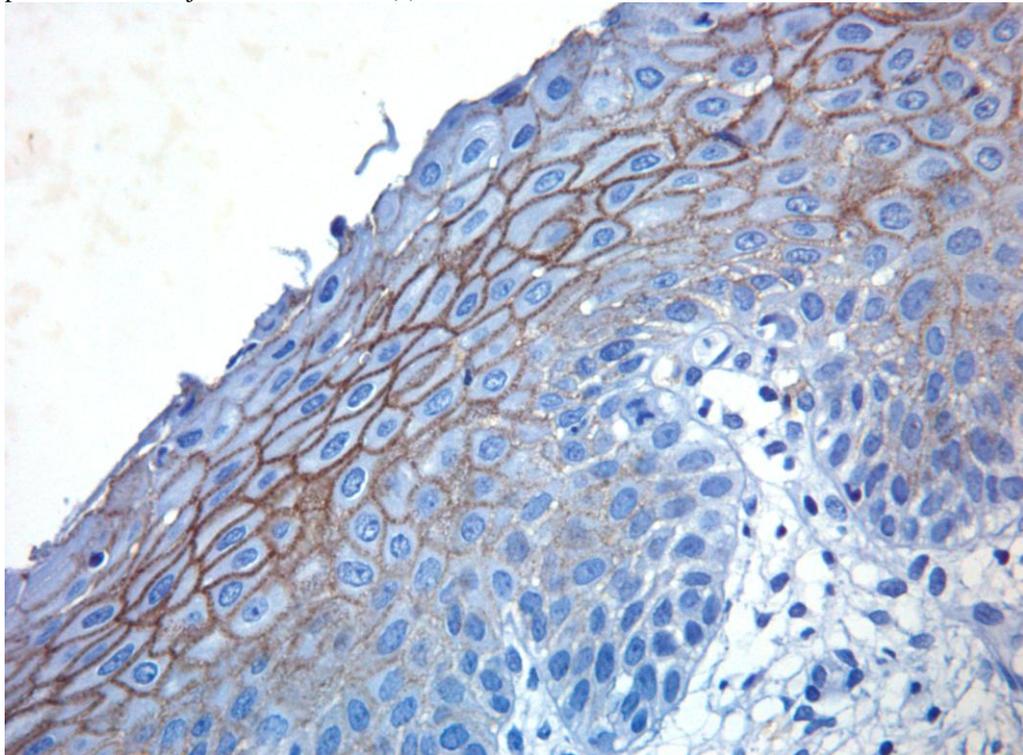
** Em 15 casos o epitélio normal adjacente às LIEAGs não teve representação

Observa-se nesta tabela uma maior frequência de expressão negativa de caderina-E na mucosa normal adjacente às LIEBGs 8/15 (53%) do que na mucosa normal adjacente às cervicites 1/8 (12%), porém a diferença não se mostrou estatisticamente significativa, $p =$

0,0858. A imunoposição negativa de caderina-E na mucosa normal adjacente às LIEAGs 6/13 (46%) também foi maior do que a expressão na mucosa normal adjacente às Cervicites 1/8 (12%), $p = 0,1736$, diferença também não significativa. Foram ainda comparadas as áreas de mucosa normal adjacentes às LIEBGs (8/15) com as áreas normais adjacentes às LIEAGs (6/13) notando-se que a expressão negativa da caderina-E, em ambas, é semelhante: 53% vs 46%, $p = 1,000$.

Ao se comparar a tabela 1 com a tabela 2 observou-se na LIEBG expressão negativa de caderina-E em $7/24 = 29\%$ dos casos, enquanto na área normal adjacente a LIEBG houve expressão negativa em 8/15 casos (53%), $p = 0,1817$. Da mesma forma, a expressão negativa da caderina-E na LIEAG foi de $7/28 (25\%)$ e no tecido normal adjacente à LIEAG foi de 6/13 (46%), $p = 0,2797$.

Figura 3 - Imunoposição de caderina-E em epitélio escamoso de revestimento do colo uterino epitélio normal adjacente a cervicite (a)



1/3 intermediário positivo - 400X

A tabela 3 apresenta a imunexpressão de caderina-E na ectocérvice e junção escamo-colunar (JEC/Metaplasia) do epitélio de revestimento, nas Cervicites, tendo em vista as regiões histológicas e as camadas da espessura epitelial.

Tabela 3 – Imunexpressão da Caderina-E em Cervicites por região histológica e na espessura epitelial

LOCALIZAÇÃO		Expressão de Caderina-E		TOTAL*
		Negativa	Positiva	
Ectocérvice	1/3 Basal	5	0	5
	1/3 Intermediário	0	5	
	1/3 Superficial	4	1	
JEC/Metaplasia	1/3 Basal	5	1	6
	1/3 Intermediário	1	5	
	1/3 Superficial	6	0	

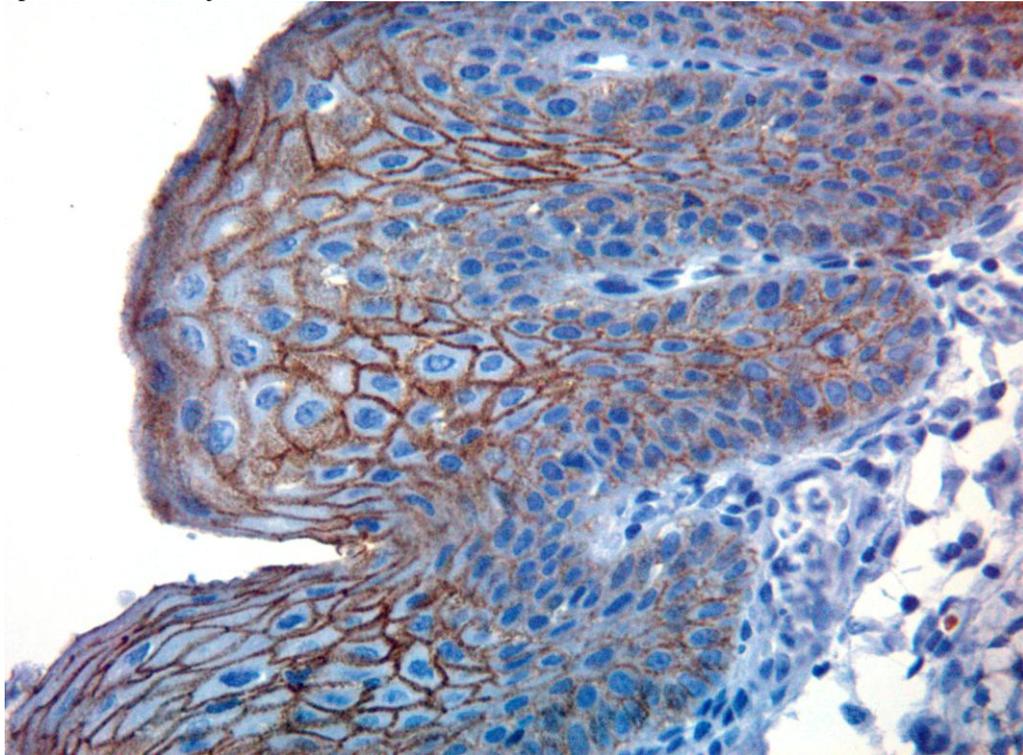
*Total de Cervicites = 8 (amostras só de ectocérvice = 2; apenas JEC = 3; ectocérvice + JEC = 3)

Na Ectocérvice há uma nítida diferença na expressão de caderina-E na espessura epitelial. No 1/3 basal nenhum dos casos (0/5) mostrou expressão positiva de caderina-E enquanto no 1/3 intermediário a expressão positiva ocorreu em todos os casos (5/5), $p = 0,0079$. Ainda nesta tabela verifica-se que a expressão positiva no 1/3 superficial (1/5) é semelhante à expressão positiva do 1/3 basal (0/5), $p = 1,000$. Ao se fazer a comparação de expressão positiva no 1/3 intermediário (5/5) com o 1/3 superficial (1/5), encontra-se diferença significativa, $p = 0,0476$.

Na JEC/Metaplasia, a imunomarcção assemelha-se à observada na ectocérvice. No 1/3 basal a expressão positiva de caderina-E foi de 1/6, diferente do 1/3 intermediário 5/6, $p = 0,0801$. Quanto ao 1/3 superficial, observa-se marcação positiva (0/6) semelhante ao 1/3 basal (1/6), $p = 1,000$. Por fim, observa-se que, como visto na ectocérvice, há diferença de expressão positiva significativa entre o 1/3 intermediário (5/6) e o 1/3 superficial (0/6), $p = 0,0152$.

Considerando cada região histológica, Ectocérvice e JEC/Metaplasia, e comparando os terços correspondentes, observa-se que a expressão de caderina-E é semelhante em cada terço, das duas regiões, 1/3 basal: ectocérvice (0/5) vs JEC/Metaplasia (1/6), $p = 1,000$; 1/3 intermediário: ectocérvice (5/5) vs JEC/Metaplasia (5/6), $p = 1,000$; 1/3 superficial: ectocérvice (1/5) vs JEC/Metaplasia (0/6), $p = 0,4545$.

Figura 4 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso do colo uterino - epitélio normal adjacente à cervicite (b)



1/3 intermediário – positivo - 400X

Tabela 4 - Imunoexpressão da Caderina-E na Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LIEBG) por região histológica e na espessura epitelial

LOCALIZAÇÃO		Expressão de Caderina-E		TOTAL
		Negativa	Positiva	
Ectocérvice	1/3 Basal	8 (80%)	2 (20%)	10*
	1/3 Intermediário	3 (30%)	7 (70%)	
	1/3 Superficial	8 (80%)	2 (20%)	
JEC/Metaplasia	1/3 Basal	15 (79%)	4 (21%)	19**
	1/3 Intermediário	7 (37%)	12 (63%)	
	1/3 Superficial	11(58%)	8 (42%)	

*Em 14 casos não havia lesão na ectocérvice. **5 casos não tinham lesão na JEC/Metaplasia

A tabela 4 apresenta a imunoexpressão de caderina-E na ectocérvice e junção escamo-colunar (JEC/Metaplasia) do epitélio de revestimento, nas LIEBGs, segundo as camadas da espessura epitelial.

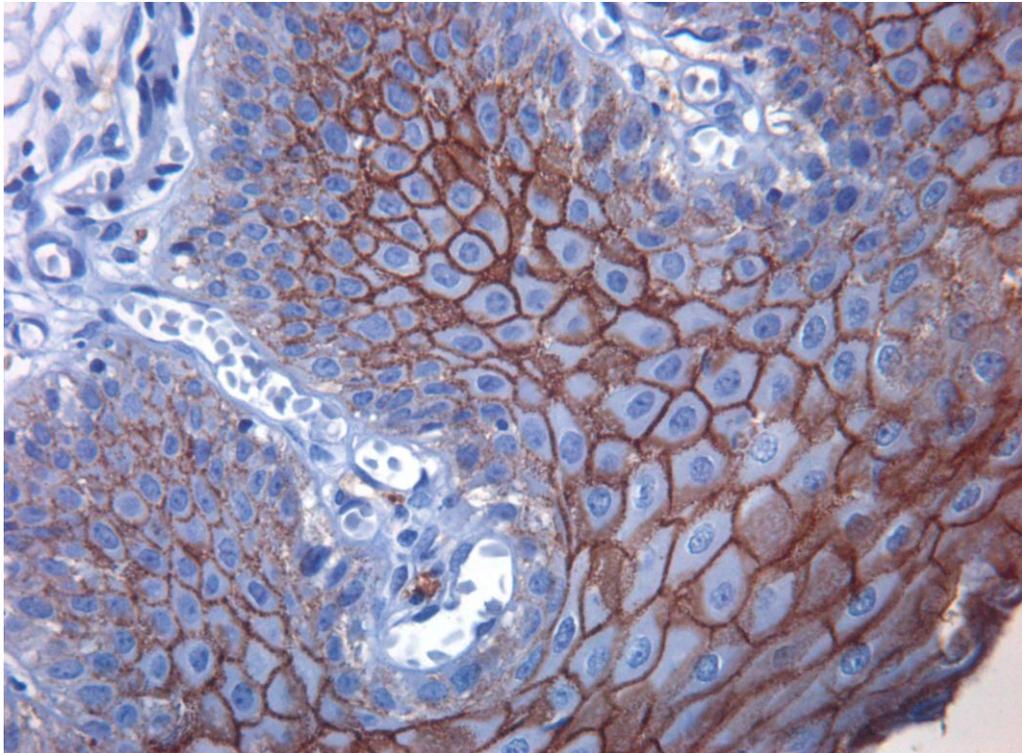
Na Ectocérvice observam-se também diferenças entre as camadas da espessura epitelial. No 1/3 basal 2/10 (20%) casos foram positivos enquanto o 1/3 intermediário mostrou expressão positiva em 7/10 (70%) casos, $p = 0,0698$. No 1/3 superficial 2/10 (20%) observou-se a mesma expressão positiva que no 1/3 basal 2/10 (20%), $p = 1,0000$. Ao se

comparar a expressão positiva no 1/3 intermediário (7/10) com o 1/3 superficial (2/10), obteve-se um valor de $p = 0,0698$. Observou-se, mais uma vez, a semelhança ao comparar os terços, basal e superficial.

Ainda na Tabela 4, na região histológica da JEC/Metaplasia, o 1/3 basal teve expressão positiva em 4/19 (21%) casos, e o 1/3 intermediário em 12/19 (63%) casos, com diferença significativa, $p = 0,0201$. A expressão positiva no 1/3 superficial (8/19) casos foi similar a do 1/3 basal (4/19), $p = 0,2953$. E na comparação da expressão positiva da caderina-E no 1/3 intermediário 12/19 e no 1/3 superficial 8/19, a diferença não foi significativa, $p = 0,3300$.

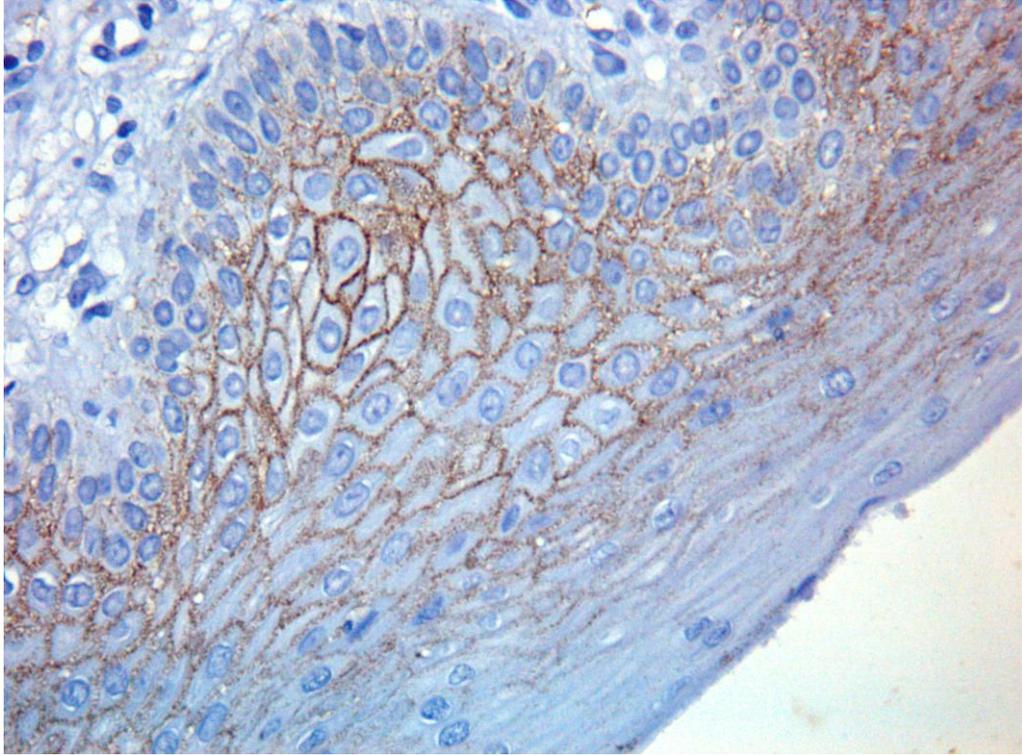
As regiões histológicas, Ectocérvice e JEC/Metaplasia também foram comparadas tomando-se o 1/3 de uma com o homólogo da outra região (Tabela 4). Os resultados da expressão positiva de caderina-E não mostraram diferenças com significado estatístico e são mostrados a seguir. No 1/3 basal: ectocérvice (2/10) vs JEC/Metaplasia (4/19) casos, $p = 1,000$; 1/3 intermediário: ectocérvice (7/10) vs JEC/Metaplasia (12/19) casos, $p = 1,000$; e no 1/3 superficial: ectocérvice (2/10) vs JEC/Metaplasia (8/19), $p = 0,4137$.

Figura 5 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso de revestimento do colo uterino LIEBG



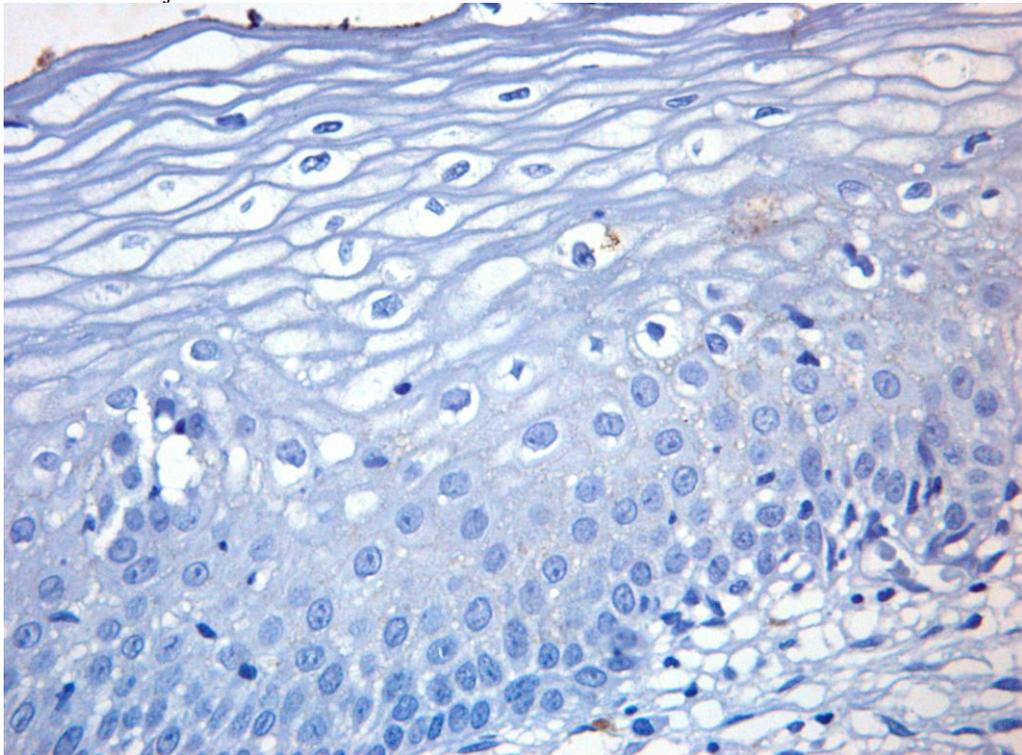
1/3 intermediário e superficial positivos - 400X

Figura 6 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso de revestimento do colo uterino - LIEBG (expressão apenas no 1/3 intermediário)



1/3 intermediário positivo - 400X

Figura 7 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso de revestimento do colo uterino - área normal adjacente à LIEBG



Todos os terços negativos - 400X

Tabela 5 – Imunoexpressão da Caderina-E na Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (LIEAG) por região histológica e na espessura epitelial

LOCALIZAÇÃO		Caderina-E		TOTAL
		Negativa	Positiva	
Ectocérvice	1/3 Basal	5 (100%)	0 (0%)	5*
	1/3 Intermediário	2 (40%)	3 (60%)	
	1/3 Superficial	3 (60%)	2 (40%)	
JEC/Metaplasia	1/3 Basal	22 (79%)	6 (21%)	28
	1/3 Intermediário	15 (54%)	13 (46%)	
	1/3 Superficial	13 (46%)	15 (54%)	

*23 casos não exibiram lesão na região da ectocérvice

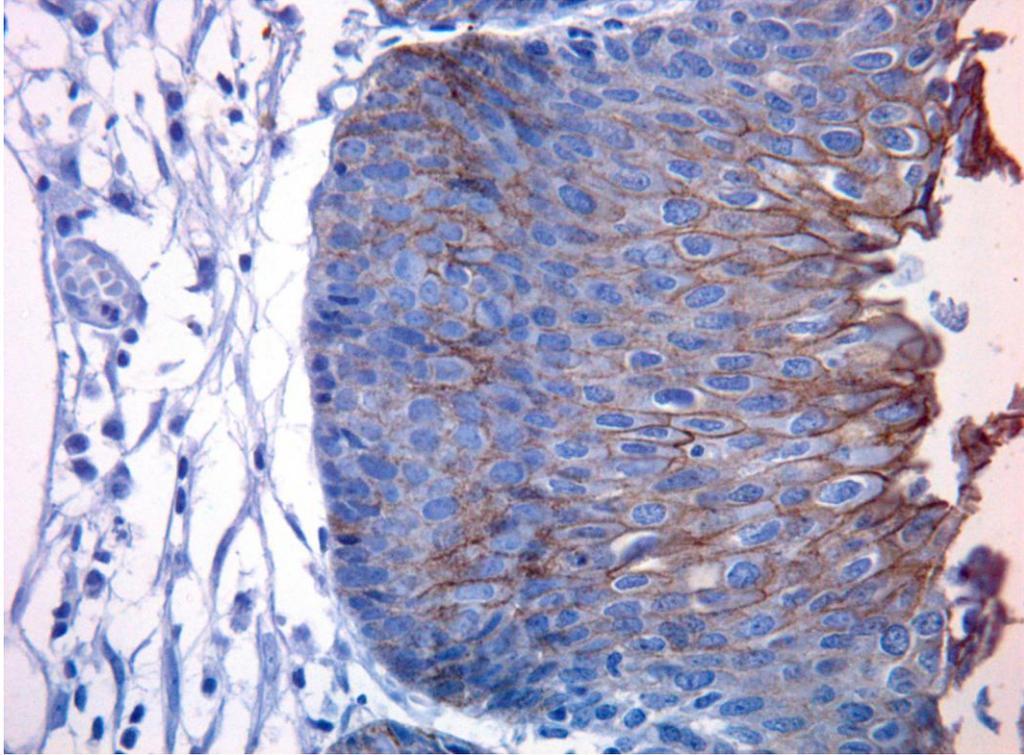
A tabela 5 mostra a imunoexpressão da caderina-E nas LIEAGs tendo em vista as regiões histológicas e as camadas da espessura epitelial.

Na Ectocérvice, a expressão positiva da caderina-E teve os seguintes resultados: 1/3 basal = 0/5 casos, 1/3 intermediário = 3/5 casos e o 1/3 superficial = 2/5 casos. Comparados entre si, os resultados não foram significantes: 1/3 basal vs 1/3 intermediário, $p = 0,1667$; 1/3 basal vs 1/3 superficial, $p = 0,444$ e 1/3 intermediário vs 1/3 superficial, $p = 1,000$.

Na JEC/Metaplasia, o 1/3 basal obteve 6/28 (21%) casos para expressão positiva; o 1/3 intermediário 13/28 (46%) casos e o 1/3 superficial mostrou expressão positiva de caderina-E em 15/28 (54%) casos. Analisando o significado estatístico encontrou-se: 1/3 basal vs 1/3 intermediário, $p = 0,0891$; 1/3 basal vs 1/3 superficial, $p = 0,0261$ e no 1/3 intermediário vs 1/3 superficial, $p = 0,7896$.

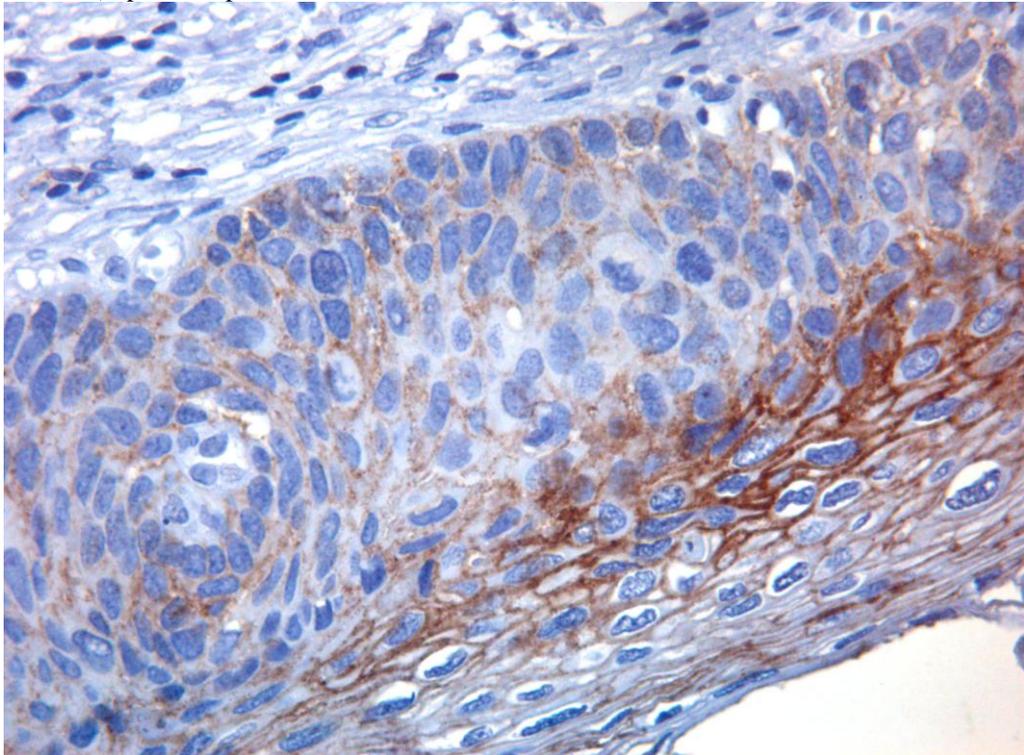
Foi ainda efetuada, a partir dos dados da tabela 5, comparação dos terços homólogos de cada região histológica obtendo-se os seguintes resultados: 1/3 basal da ectocérvice vs JEC/Metaplasia, $p = 0,5563$; 1/3 intermediário da ectocérvice vs JEC/Metaplasia, $p = 0,6562$ e 1/3 superficial da ectocérvice vs JEC/Metaplasia, $p = 0,6562$. Estes dados não mostraram diferenças significantes.

Figura 8 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso de revestimento do colo uterino - LIEAG



1/3 intermediário e superficial positivos para a caderina-E - 400X

Figura 9 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso de revestimento de colo uterino - LIEAG (expressão apenas no 1/3 intermediário)

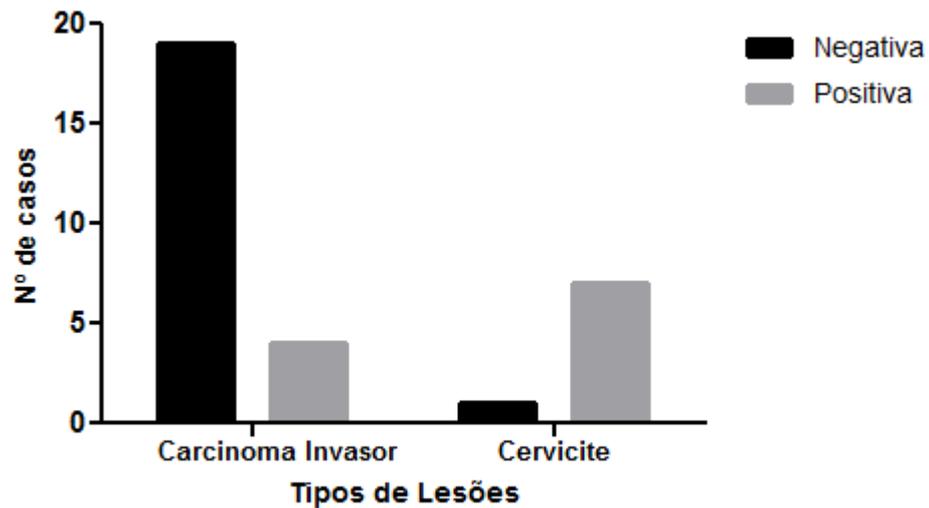


1/3 intermediário positivo - 400X

O acentuado predomínio de expressão negativa da caderina-E nos carcinomas invasivos ($19/23 = 83\%$) em relação às cervicites ($1/8 = 12\%$), às LIEBGs ($7/24 = 29\%$) e às LIEAGs ($7/28 = 25\%$) foi mostrado na tabela 1.

Na figura 10 compara-se a expressão negativa desta proteína de adesão no Carcinoma Invasor ($19/23 = 83\%$) e nas Cervicites ($1/7 = 12\%$), e encontra-se diferença significativa ($p = 0,0009$).

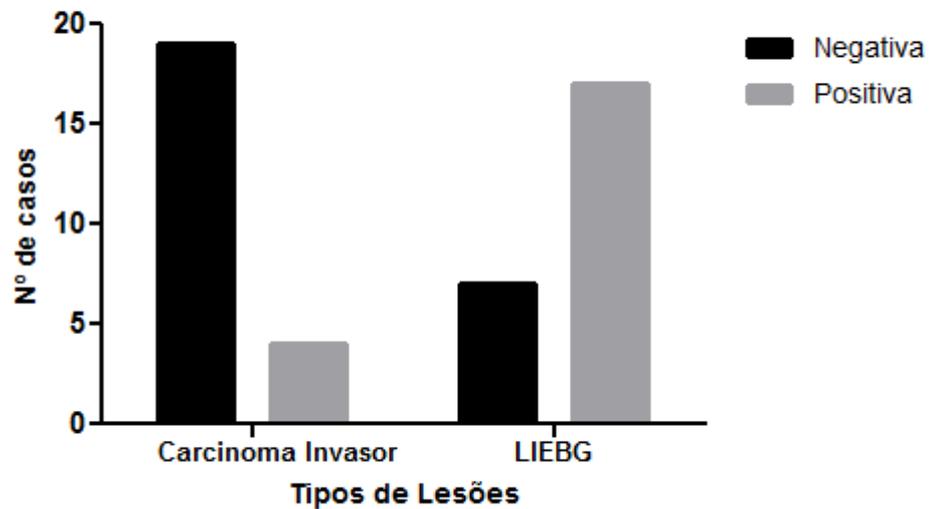
Figura 10 - Imunoexpressão de Caderina-E no Carcinoma Invasor do colo uterino e na Cervicite



$p = 0,0009$

Na figura 11, a seguir, novamente se verifica o grande predomínio da expressão negativa da caderina-E nos Carcinomas Invasor em relação às LIEBGs ($19/23 = 83\%$ vs $7/24 = 29\%$), $p = 0,0004$.

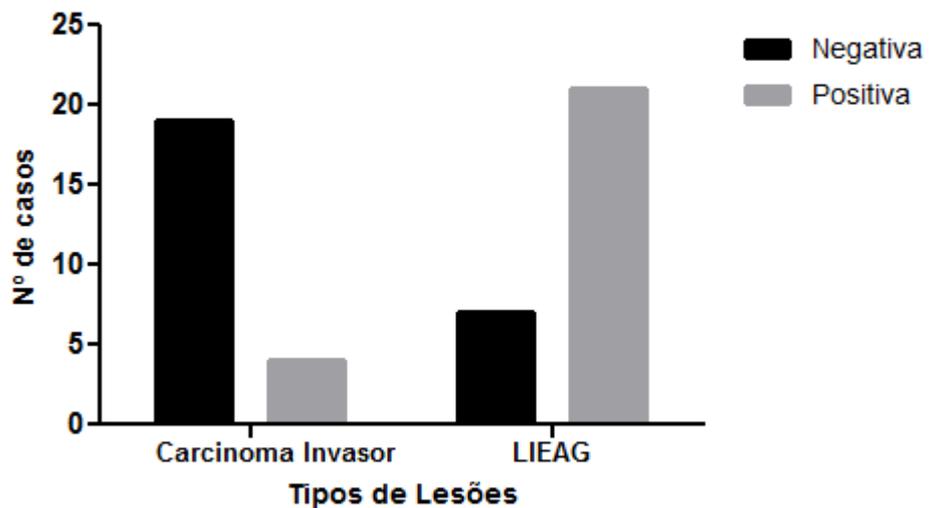
Figura 11 - Imunoexpressão de Caderina-E no Carcinoma Invasor do colo uterino e na LIEBG



$p = 0,0004$

De maneira similar, observa-se na figura 12 que é nítida a maior expressão negativa da caderina-E no carcinoma invasor ao compará-lo com as LIEAGs ($19/23 = 83\%$ vs $7/28 = 25\%$), $p < 0,0001$.

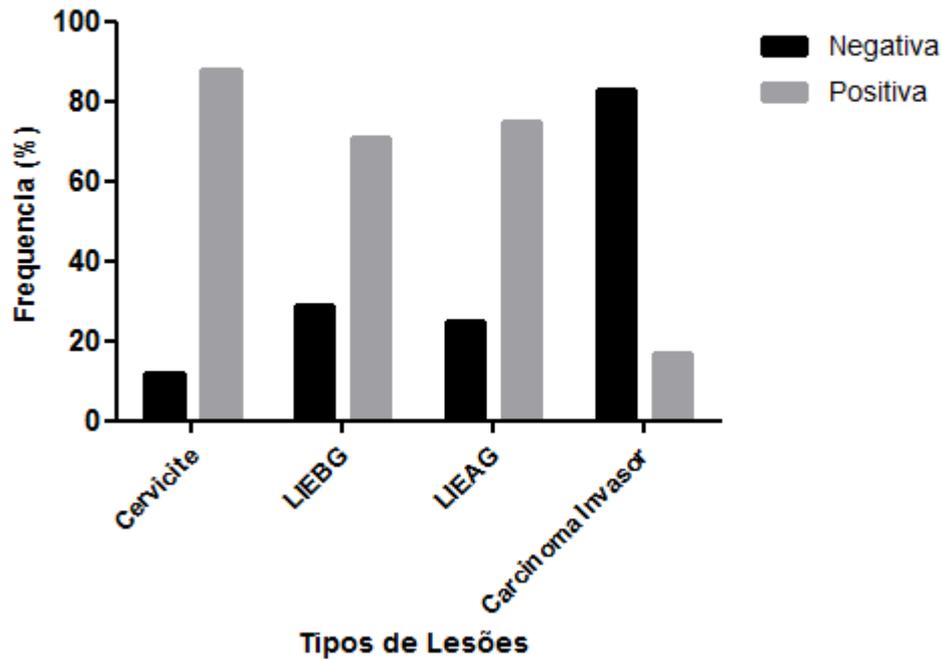
Figura 12 - Imunoexpressão de Caderina-E no Carcinoma Invasor do colo uterino e na LIEAG



$p < 0,0001$

A figura 13, abaixo, apresenta em valores relativos, de forma mais evidente, a comparação do Carcinoma Invasor com as demais lesões (Cervicite, LIEBG e LIEAG).

Figura 13 - Imunoexpressão de Caderina-E na Cervicite, LIEBG, LIEAG e no Carcinoma Invasor do colo uterino



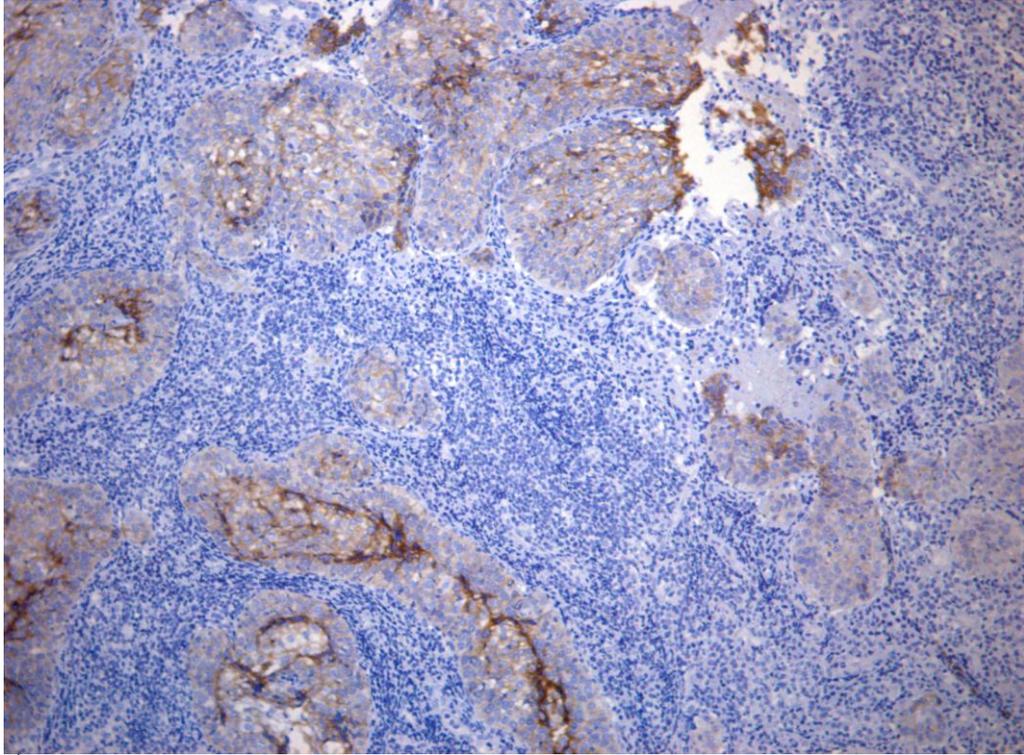
Foi também efetuada a comparação entre o Carcinoma Invasor *vs* (LIEBG + LIEAG) respectivamente ($19/23 = 83\%$) *vs* ($14/52 = 27\%$), $p < 0,0001$. Por fim, comparou-se o Carcinoma Invasor com todas as lesões e, incluindo as cervicites e os resultados foram: ($19/23 = 83\%$) *vs* ($15/60 = 25\%$), $p < 0,0001$.

Finalmente, a tabela 6 mostra a expressão de Caderina-E em duas regiões histológicas distintas dos blocos de células cancerosas invasoras: área central do bloco celular tumoral propriamente dito e sua periferia, aqui denominada, margem de invasão. Os resultados revelam predomínio acentuado da marcação negativa em ambas as regiões, sem diferença significativa (área central: $19/23$ *vs* margem de invasão: $22/23$; $p = 0,3463$).

Tabela 6 – Imunoexpressão da Caderina-E no Carcinoma Invasor do Colo Uterino

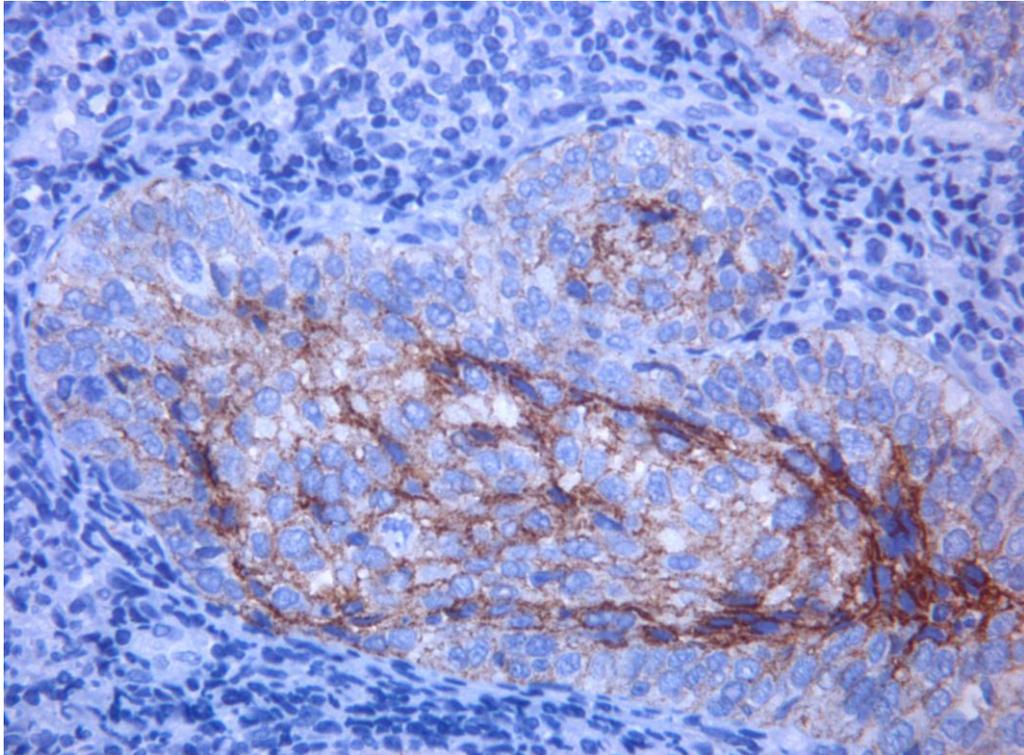
LOCALIZAÇÃO	Expressão de Caderina-E		TOTAL
	Negativa	Positiva	
Área Central	19 (83%)	4 (17%)	23
Margem de Invasão	22 (96%)	1 (4%)	23

Figura 14 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso de colo uterino - Carcinoma Invasor



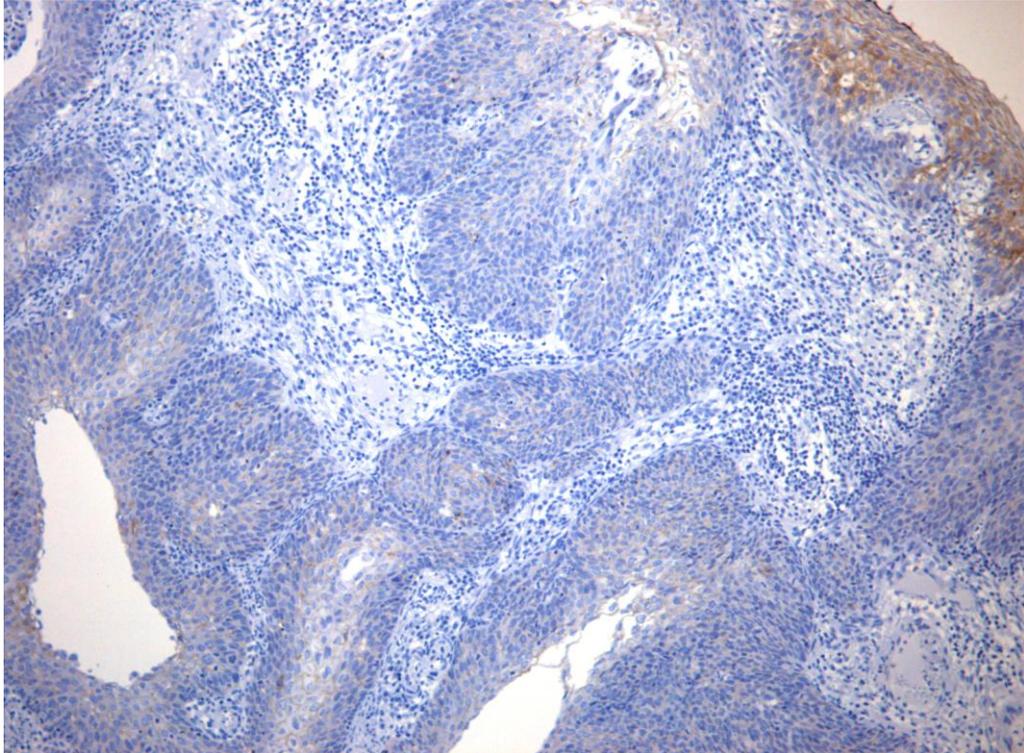
Área central positiva - Margem de invasão negativa - 100X

Figura 15 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso do colo uterino - Carcinoma Invasor (detalhe)



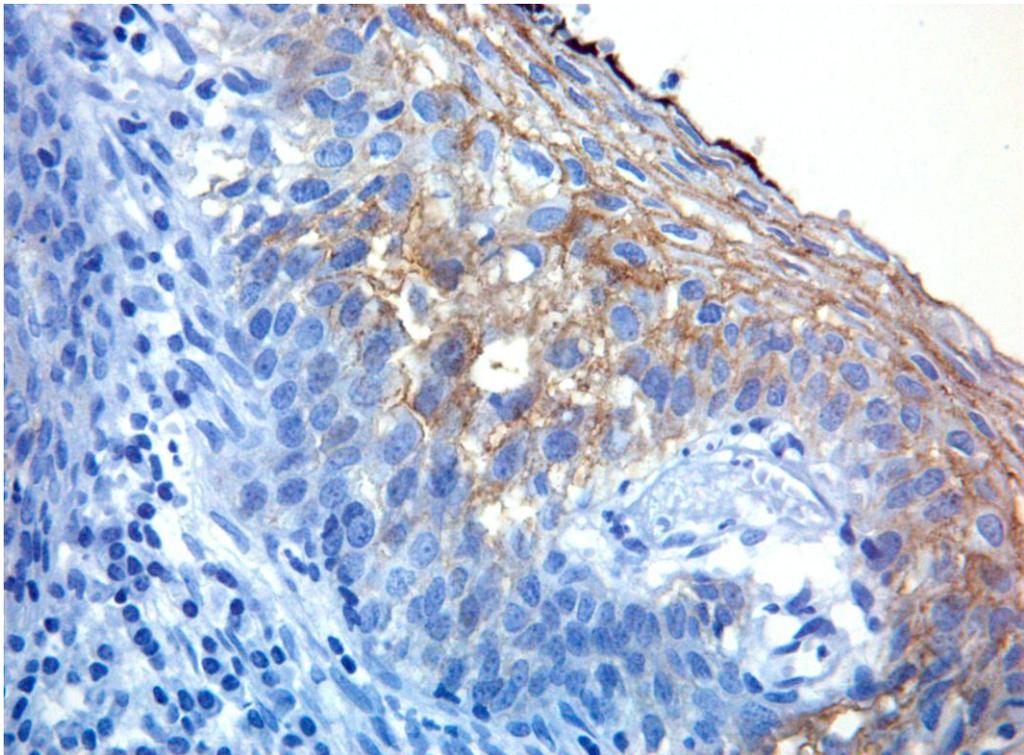
Área central positiva - Margem de invasão negativa - 400X

Figura 16 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso do colo uterino - Carcinoma Invasor com LIEAG contígua



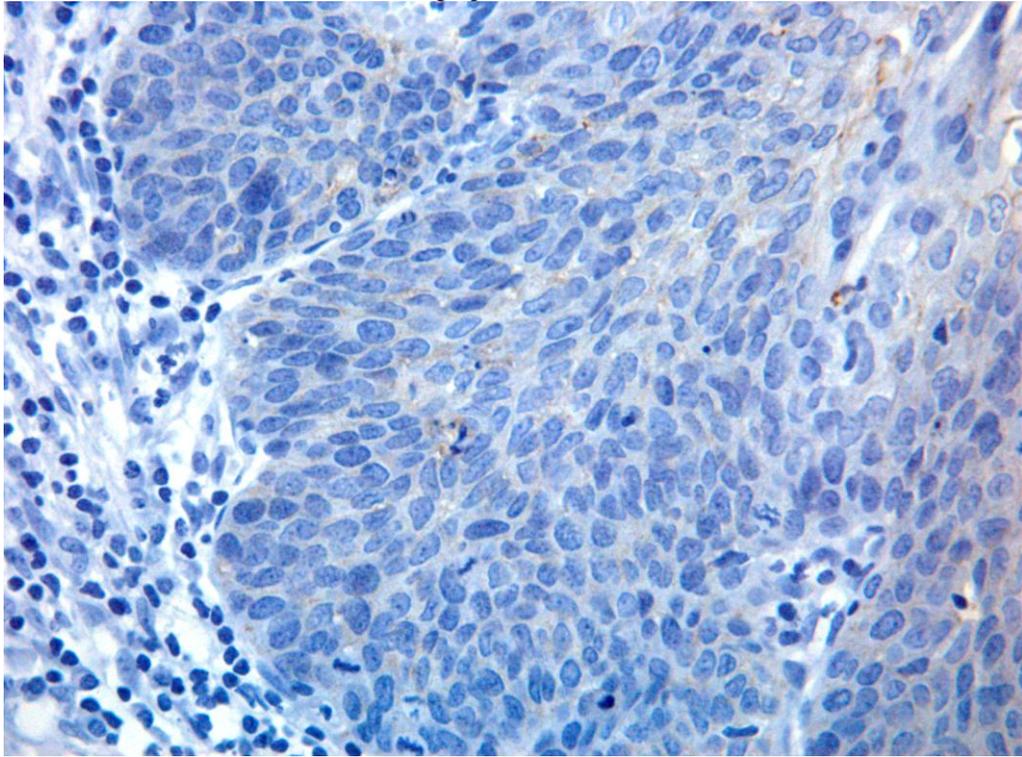
Carcinoma Invasor negativo - LIEAG contígua positiva - 100X

Figura 17 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso do colo uterino - Carcinoma Invasor com LIEAG contígua (detalhe)



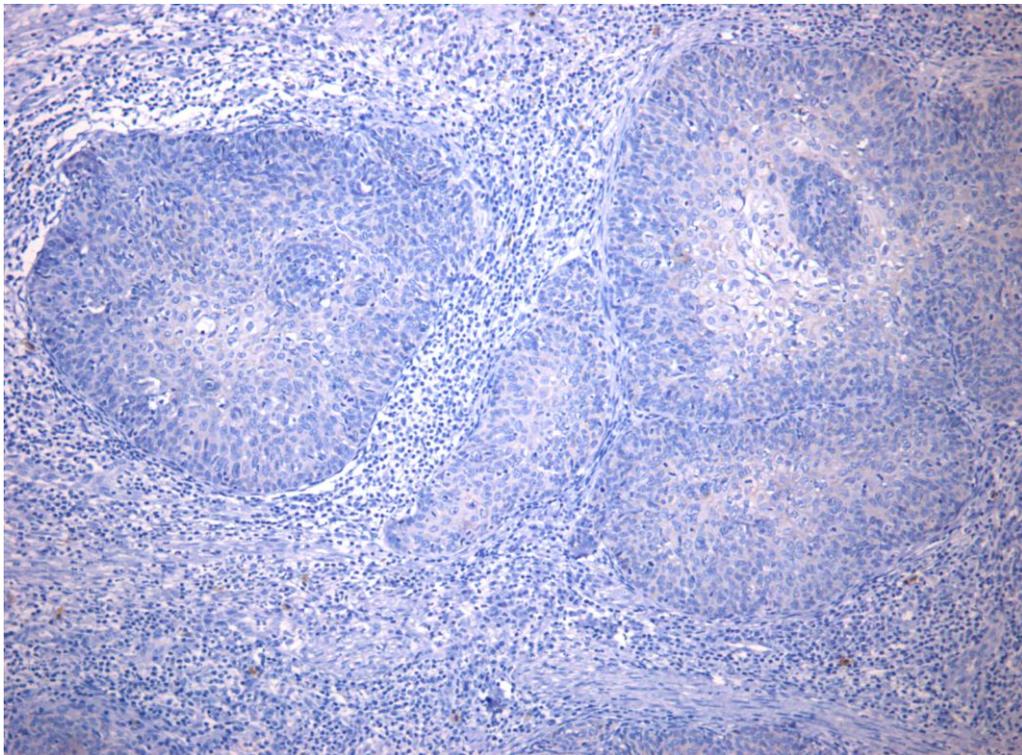
Carcinoma invasor negativo - LIEAG contígua positiva - 400X

Figura 18 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso do colo uterino - Carcinoma Invasor (detalhe de células agrupadas invasivas)



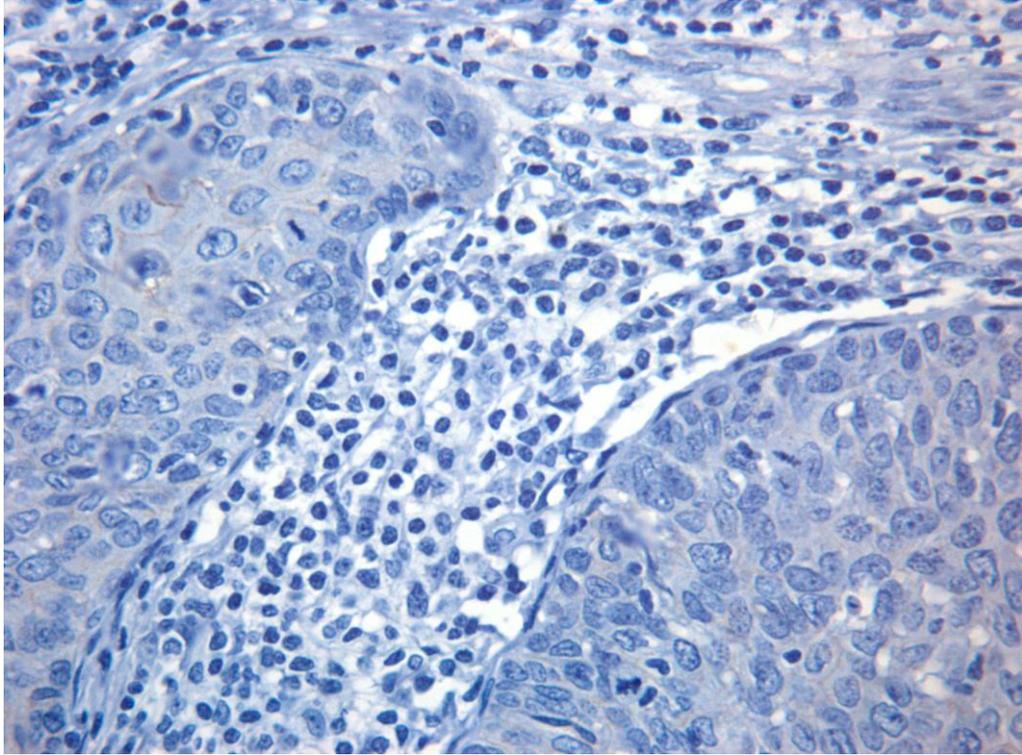
Expressão negativa - 400X

Figura 19 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso do colo uterino - Carcinoma invasor (ninhos infiltrantes)



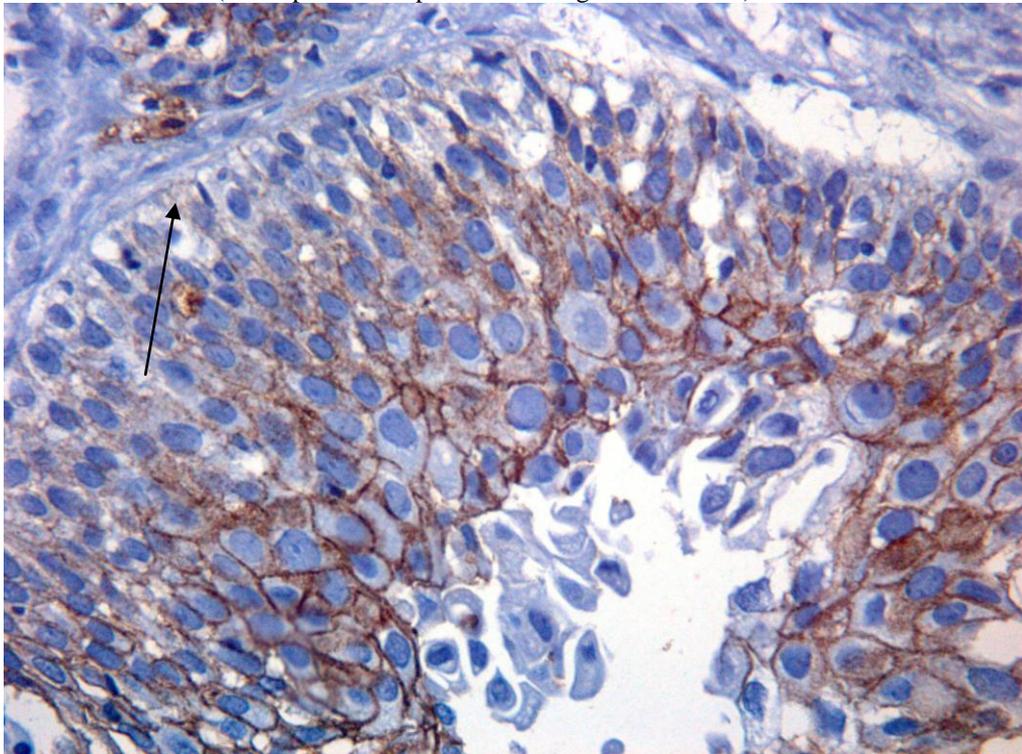
Expressão negativa - 100X

Figura 20 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso do colo uterino (grupos de células agrupadas invasivas com estroma de permeio)



Expressão negativa - 400X

Figura 21 - Imunoexpressão de caderina-E em epitélio escamoso do colo uterino - Carcinoma invasor (nítida perda de expressão na margem de invasão)



Área central positiva - Margem de invasão negativa - 400X

5 DISCUSSÃO

Neste estudo procurou-se comparar a imunexpressão da caderina-E, importante molécula de adesão relacionada à carcinogênese em vários tipos de lesões do colo uterino, incluindo as cervicites, lesões intraepiteliais escamosas e carcinomas invasores.

Numa observação global de todos os resultados obtidos (Tabela 1) constatou-se nítida diferença de expressão da caderina-E membranar entre as cervicites e as neoplasias sendo o carcinoma invasor aquela que mostrou maior significância estatística quando comparada às cervicites ($p = 0,0009$). Nas LIEs, os números para a marcação negativa foram semelhantes LIEBG = 29% e LIEAG = 25%, não muito diferentes dos resultados obtidos por Rodríguez-Sastre *et al.*, (2005) que encontraram, em estudo similar, uma tendência ao desaparecimento da caderina-E membranar em 40% dos casos das lesões intraepiteliais escamosas. No entanto, na comparação das LIEs com o tecido normal, os mesmos autores obtiveram dados diferentes ($p = 0,0108$) dos aqui encontrados ($p = 0,6657$). Porém é na comparação entre a expressão da caderina-E nas LIEs e no carcinoma invasor que os supracitados pesquisadores mais divergiram do atual estudo e mesmo surpreenderam ao informar ausência de diferença significativa ($p = 0,7230$) enquanto nesta pesquisa foi revelada alta significância ($p < 0,0001$).

Para Méndez e Bosch (2011), diferentes resultados entre diversos estudos podem ser consequência de variações de tipos de técnicas para métodos de recuperação antigênica tanto quanto da especificidade dos anticorpos primários utilizados assim como da aplicação de parâmetros distintos na interpretação dos resultados da imunohistoquímica.

Foi definido como outro objetivo neste estudo comparar a expressão negativa da caderina-E, nas Lesões Intraepiteliais Escamosas (LIEs), na área lesional propriamente dita, com o epitélio normal adjacente a estas lesões (Tabelas 1 e 2), considerado este aspecto de relevância em razão da obtenção de resultados não esperados.

De início, com relação à LIEBG, chama à atenção a expressão negativa de caderina-E na lesão (29%), inferior à da sua área normal adjacente (53%) revelando aspectos não esclarecidos até a conclusão deste estudo. E, ao comparar as LIEBGs com as cervicites, são observadas diferenças que, mesmo não tendo sido significantes, parecem indicar uma tendência crescente na expressão negativa da caderina-E. Uma maior expressão negativa nas LIEBGs em relação às cervicites é esperada e também descrita por outros autores (RODRÍGUEZ-SASTRE *et al.*, 2005; MENDÉZ; BOSCH, 2011). Porém, a explicação por que ocorreu maior perda de expressão membranar na área normal adjacente à LIEBG do que na própria lesão (Tabelas 2 e 1), permanece desconhecida. Pode-se argumentar que o número

de casos de áreas normais adjacentes à LIEBG seja eventual causa de viés, pois, como foi visto, o “n” total de LIEBGs = 24 (Tabela 1) não teve representação equivalente nas correspondentes áreas normais adjacentes, n = 15 (Tabela 2). Esta diferença, no entanto, não se mostrou significativa, $p = 0,1817$.

A LIEAG, de forma similar, mostra marcação negativa mais expressiva em sua área normal adjacente (46%) se comparada à própria lesão, (25%). Novamente, pode-se discutir acerca do menor número de casos, n = 13 (Tabela 2) nas áreas normais adjacentes do que o “n” total de LIEAGs = 28 (Tabela 1) como possível causa deste resultado, porém esta diferença, mais uma vez, não se mostrou significativa, $p = 0,2797$. Na comparação das LIEAGs (25%) com as cervicites (12%), os números relativos são mais elevados nas LIEAGs, todavia sem significância estatística, $p = 0,6514$. A imunomarcção negativa da caderina-E nas LIEAGs *vs* cervicites em suas correspondentes áreas adjacentes mostrou resultados diversos, 46% *vs* 12% (Tabela 2) respectivamente, que, no entanto também não exprimem diferença significativa. Papadavid *et al.*, (2002), em estudo de cento e vinte e dois tumores de pele tendo suas áreas adjacentes sido usadas como controles internos, encontraram, nestes sítios contíguos, uma expressão de caderina-E positiva em todos os casos.

Numa análise concernente às LIEs supracitadas e suas áreas normais adjacentes, os resultados encontrados mostram a aparente tendência para marcação predominantemente negativa da caderina-E (LIEBG = 53% e LIEAG = 46%) quando comparadas às cervicites (12%) mesmo sendo sem significância em suas diferenças: LIEBG *vs* cervicite, $p = 0,0858$ e LIEAG *vs* cervicite, $p = 0,1736$. Pode-se, de fato, especular sobre a possibilidade de comportamento diferenciado, nas áreas ditas normais adjacentes às LIEs, com tendência à marcação negativa por alguma influencia parácrina de células epiteliais nas zonas de lesão.

Realmente, a partir dos recentes conhecimentos sobre o microambiente tumoral, sabe-se que o estroma hospedeiro desempenha papel fundamental no crescimento maligno e que tumores em desenvolvimento podem liberar sinais que rompem a homeostase do tecido normal e desencadeiam respostas das células vizinhas promovendo a liberação de moléculas bioativas que influenciam e favorecem o crescimento do próprio tumor (ARIZTIA *et al.*, 2006). Por outro lado, com a mesma importância, está o papel do papilomavírus humano em sua habilidade para reduzir a expressão da caderina-E celular. É fato estabelecido que os proto-oncogenes E6 e E7 do HPV estão implicados na falha de expressão desta molécula de adesão (MATTHEWS *et al.*, 2003; HUBERT *et al.*, 2005; LAURSON *et al.*, 2010; LEONG *et al.*, 2010). Estes dados tomados em conjunto fortalecem a noção de que a progressão tumoral também depende do estroma ou do microambiente tumoral e não somente da

instabilidade genética das células neoplásicas (ARIZTIA *et al.*, 2006). Realmente, Giannini *et al.*, (2002), em trabalho relacionado, afirmaram que a infecção pelo HPV por si só não era o suficiente para o desenvolvimento do câncer, e, tal percepção, foi compartilhada por Snijders *et al.*, (2006), em estudo versando sobre a carcinogênese cervical mediada pelo HPV.

Também foi efetuada a comparação entre a expressão negativa da caderina-E entre as LIEs (29% *vs* 25%), sem diferença estatística, e entre as áreas normais adjacentes às LIEs, evidenciando-se semelhança na marcação dos dois tipos de lesões LIEBGs (53%) *vs* LIEAGs (46%), $p = 1,000$.

É possível haver, nas áreas normais mais próximas às lesões, um sítio de maior potencial evolutivo na direção destas neoplasias intraepiteliais. Carvalho *et al.*, (2012), ao tratar sobre taxa de recorrência lesional de 20% após excisões tumorais com margens histologicamente livres, avaliam que o exame histológico intraoperatório não pode detectar alterações moleculares que não envolvem mudanças fenotípicas nas células, que, no entanto, as colocam numa via tumorigênica. Slaughter, Southwick e Smejcal (1953) já haviam chamado a atenção para o que denominaram de "campo de cancerização" ou, ainda, "campo de epitélio pré-condicionado" na área adjacente ao tumor, que por ser portador de mudanças irreversíveis e ainda desconhecidas, marcharia para um processo de câncer de forma inevitável, isto, podendo ser a causa maior para falhas no tratamento devido à alta propensão para desenvolver recorrências locais e segundos tumores primários. Assim, se pode indagar como seria a imunexpressão da caderina-E em outras áreas de mucosa normal do mesmo colo, porém distantes ou não limitantes com a lesão, investigação, esta, impraticável neste estudo, realizado predominantemente em biópsias ou peças pequenas.

De qualquer forma, segundo Jeffers *et al.*, (1997), parece improvável que um processo biológico complexo, como a invasão estromal, seja regulado por uma só proteína e que uma sequencia de mudanças incluindo alterações em outras moléculas de adesão devem ser provavelmente necessárias para o desenvolvimento de um fenótipo plenamente invasivo.

Em outra finalidade deste estudo, nas cervicites, considerando as regiões histológicas ectocérvice (epitélio nativo) e JEC/Metaplasia³ e, ainda levando-se em conta a espessura do epitélio escamoso normal e sua divisão em três camadas (basal, intermediária e

³ O *portio* cervical nativo ou ectocérvice é recoberto por epitélio escamoso estratificado. A endocérvice é constituída por epitélio cilíndrico. O termo junção escamo-colunar (JEC) é usado para descrever a união dos dois tipos de epitélio: o estratificado escamoso e o colunar ou cilíndrico. A metaplasia, por sua vez, define a mudança de um epitélio cilíndrico maduro para um tipo escamoso também maduro a partir das células de reserva. Esta região é de interesse especial para os estudiosos do câncer cervical por ser, atualmente, considerada, sede inicial do tumor de colo uterino (GOVAN *et al.*, 1969; STERN, 1973; De BOER *et al.*, 1999; DELVENNE; HUBERT; JACOBS, 2004; NARISAWA-SAITO; KIYONO, 2007; CABERG *et al.*, 2008; SZALMÁS; KÓNYA, 2009).

superficial; Tabela 3), procurou-se avaliar eventuais diferenças na expressão da caderina-E entre cada um destes sítios histológicos e, também, nos diferentes estratos⁴. Ao eleger este aspecto para análise deve-se ao mesmo tempo reconhecer a vulnerabilidade dos resultados e da interpretação dos dados obtidos, em razão do reduzido número de casos de cervicite (08) utilizados nesta pesquisa.

Na região da ectocérvice, destes casos de cervicite, foi encontrada nítida diferença de marcação da caderina-E segundo a espessura epitelial no revestimento. Nestas amostras, o terço intermediário mostrou predomínio de marcação positiva quando comparado aos terços basal e superficial: 1/3 intermediário vs 1/3 basal, $p = 0,0079$; 1/3 intermediário vs superficial, $p = 0,0476$ ambas comparações significantes. Evidenciou-se, igualmente, a similitude de expressão ao se observar o terço basal vs terço superficial, $p = 1,000$. Estes resultados se assemelham aos de De Boer *et al.*, (1999), porém diferem daqueles obtidos por Jeffers *et al.*, (1997), para quem forte marcação membranar da caderina-E, nos controles normais, foi encontrada tanto na camada basal como na intermediária, conclusão, esta, também compartilhada por Hubert *et al.*, (2005) e por Caberg *et al.*, (2008) em estudos mais recentes.

Na JEC/Metaplasia a marcação da caderina-E foi semelhante àquela observada na ectocérvice sempre com predominância de imunomarcação positiva no 1/3 intermediário com diferenças significantes ou muito próximas: 1/3 intermediário vs 1/3 basal, $p = 0,0801$; 1/3 intermediário vs 1/3 superficial, $p = 0,0152$. Mais uma vez, os terços, basal e superficial foram semelhantes em suas expressões de caderina-E: 1/3 basal vs 1/3 superficial, $p = 1,000$.

Ainda nas cervicites (Tabela 3), os três estratos de cada uma destas regiões histológicas (Ectocérvice e JEC/Metaplasia) também foram comparados, cada um, com o seu correspondente na outra região e verificou-se a semelhança na expressão da caderina-E entre cada par equivalente (1/3 basal: ectocérvice vs JEC/Metaplasia, $p = 1,000$; 1/3 intermediário: ectocérvice vs JEC/Metaplasia, $p = 1,000$; 1/3 superficial: ectocérvice vs JEC/Metaplasia, $p = 0,4545$).

Enfim, numa observação global da expressão positiva da caderina-E nas cervicites (88% dos casos), vista aqui, encontram-se evidências para entender por que Méndez e Bosch (2011), de forma categórica, concluíram que as moléculas de adesão mostram forte expressão em tecidos epiteliais benignos sem exceções.

As LIEBGs também foram estudadas segundo seus sítios histológicos, Ectocérvice & JEC/Metaplasia, e suas diferentes camadas de estratificação, basal,

⁴ As neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) nos seus três graus evolutivos (NIC I, NIC II e NIC III) fundamentam-se justamente nesta divisão de camadas (RICHART, 1967; ZIMMERMANN *et al.*, 2010).

intermediária e superficial (Tabela 4). Na região da Ectocérvice vê-se nítida diferença de expressão positiva da caderina-E no terço intermediário (70%) enquanto os terços, basal e superficial, se equivalem em percentual muito menor (20%). Observa-se o predomínio de marcação positiva da caderina-E do terço intermediário com relação aos outros.

Na JEC/Metaplasia, observa-se também clara predominância de expressão positiva no terço intermediário (63%). O terço basal mostrou, em termos relativos, expressão menor com relação ao terço superficial (21% e 42% respectivamente).

Ainda com relação às LIEBGs (Tabela 4) as regiões histológicas, Ectocérvice e JEC/Metaplasia foram comparadas conforme seus diferentes terços (basal, intermediário e superficial) emparelhando-se em cada terço o resultado da expressão em uma e outra região. Evidenciou-se que não há diferença estatística na imunoposição da caderina-E entre regiões histológicas nativas e metaplásicas: 1/3 basais ectocérvice (20%) *vs* JEC/Metaplasia (21%), $p = 1,000$; 1/3 intermediários ectocérvice (70%) *vs* JEC/Metaplasia (63%), $p = 1,000$ e os 1/3 superficiais ectocérvice (20%) *vs* JEC/Metaplasia (42%), $p = 0,4137$. As lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (LIEAGs; Tabela 5) foram avaliadas conforme mesma sistematização como já visto anteriormente. Note-se que, aqui, não se pode afirmar que haja predomínio na expressão positiva da caderina-E no terço intermediário, ao contrário, a distribuição, por camadas parece apresentar uma tendência à equivalência principalmente, ao se observar a região histológica JEC/Metaplasia onde o terço intermediário obteve ainda menor expressão (46%) da caderina-E do que no terço superficial (54%). De fato, segundo Jeffers *et al.*, (1997), nas LIEAGs, a expressão da caderina-E membranar ocorreu em todas as camadas do epitélio displásico na maioria dos casos da sua pesquisa.

Especificamente nestas amostras das LIEAGs, os resultados referentes à ectocérvice podem ser questionados em razão do reduzido “n”, explicável pelo simples fato de que a área lesional na região histológica da ectocérvice esteve representada apenas em cinco casos. Evidentemente, este pequeno número pode originar um viés na comparação de resultados. Apesar disso, comparativamente à situação similar nas LIEBGs (Tabela 4), aqui, os números não parecem tão discrepantes: 1/3 basal = 0% para marcação positiva da caderina-E *vs* 20% nas LIEBGs; 1/3 intermediário = 60% para marcação positiva *vs* 70% nas LIEBGs; 1/3 superficial = 40% para expressão positiva *vs* 20% nas LIEBGs.

Nesta amostragem das LIEAGs, o comportamento da expressão da caderina-E nos diferentes estratos mostrou alguma semelhança ou reproduziu alguns resultados próximos aos esperados, mesmo que questionáveis na região da ectocérvice – como explicado no parágrafo anterior. E, no sítio JEC/Metaplasia, não se observou o predomínio de marcação positiva no

terço intermediário (46%) tal como observado até agora nas cervicites (Tabela 3) e nas LIEBGs (Tabela 4). Nesta região histológica (JEC/Metaplasia), todos os 28 casos tiveram representação da lesão. Mesmo não sendo este um “n” elevado, pode-se especular sobre a possibilidade de tendência para a diminuição da expressão positiva da caderina-E neste tipo de lesão considerada limítrofe ao câncer, onde, sabe-se do predomínio de imunomarcagem negativa da caderina-E, ou, ausência de expressão membranar.

Em suporte a estes achados, Méndez e Bosch (2011), argumentam que, nos tecidos neoplásicos, há uma disposição para a redução da imunoreatividade da caderina-E. Reforçando esta observação, Caberg *et al.*, (2008) em sua pesquisa detectaram uma progressiva perda na imunoexpressão da caderina-E à medida que as lesões evoluíam em severidade. E, de forma incisiva, Van Roy e Berx (2008), em artigo de revisão, concluem que está bem firmado o conceito de que os tumores epiteliais perdem parcial ou completamente a caderina-E, à medida que progridem na malignidade.

Ainda nas LIEAGs (Tabela 5), os terços homólogos de cada região histológica foram comparados, porem, com diferenças sem significância estatística em seus resultados: 1/3 basal da ectocérvice vs JEC/Metaplasia, $p = 0,5563$; 1/3 intermediário da ectocérvice vs JEC/Metaplasia, $p = 0,6562$ e 1/3 superficial da ectocérvice vs JEC/Metaplasia, $p = 0,6562$.

Já havia sido mostrado anteriormente (Tabela 1) o nítido predomínio de marcação negativa no carcinoma invasor do colo uterino ao compará-lo com as demais lesões mostradas na mesma tabela: cervicites, LIEBGs e LIEAGs. A representação destas comparações mostradas nas figuras 10, 11, 12 e 13 é ainda muito mais demonstrativa e convincente.

Inicialmente (Figura 10) foram colocados, lado a lado, o carcinoma invasor e as cervicites, com predominante expressão negativa da caderina-E neste tipo de câncer e a diferença entre estas duas lesões mostrou-se altamente significativa: expressão negativa no carcinoma invasor (83%) e nas cervicites (12%), ($p = 0,0009$).

Ao se comparar o carcinoma invasor com as LIEBGs (Figura 11) evidenciou-se, mais uma vez, o contraste entre as expressões negativas da caderina-E de um e de outro com indiscutível diferença: carcinoma invasor (83%) vs LIEBGs (29%), $p = 0,0004$. Aqui, porem, parece pertinente comentar a ocorrência de um aumento, embora não significativo, na expressão negativa da caderina-E ao se comparar com as cervicites: LIEBGs (29%) vs cervicites (12%).

Seguindo o mesmo modelo comparativo foram submetidos à análise, o carcinoma invasor e as LIEAGs (Figura 12) quando igualmente se constatou clara diferença de marcação

negativa da caderina-E no tumor: 83% vs 25%, $p < 0,0001$. Novamente se observou elevação da expressão negativa se comparada àquela da cervicite: LIEAGs (25%) vs cervicites (12%).

Assim, nas situações acima discutidas (Figuras 10, 11 e 12) os dados obtidos podem ser considerados como esperados, com imunomarcção negativa predominante sempre no tumor ao compará-lo com as LIEs. Notou-se também um aparente *crescendo* da expressão negativa da caderina-E ao se tomar as LIEs em comparação às cervicites, mostrando, talvez, já discreta tendência à perda de expressão positiva da caderina-E nestas lesões precursoras. Apesar de ser, esta, uma observação pertinente, é também questionável já que as diferenças não mostraram significância: LIEBGs (29%) vs cervicite (12%), $p = 0,6417$ e LIEAGs (25%) vs cervicites (12%), $p = 0,6514$.

Ao se comparar em uma mesma figura os quatro tipos de lesões (Figura 13) observa-se nítida diminuição de expressão membranar da caderina-E, a partir da cervicite na direção do carcinoma invasor. Estes dados revelam que a expressão membranar da caderina-E na célula epitelial é inversamente proporcional ao grau da neoplasia, com menor expressão nas lesões de alto grau e carcinomas *in situ* do colo uterino e praticamente ausente nos carcinomas invasores, em acordo com outros relatos (WU; ZHOU, 2008; MUNHOZ *et al.*, 2009; ZIMMERMANN *et al.*, 2010).

Neste estudo, observando os carcinomas invasores, inicialmente pareceu haver, nos blocos invasivos, tendência a um comportamento de marcação distinto entre o centro e sua periferia ou margens (Tabela 6). Desta forma procurou-se averiguar a existência de eventuais diferenças entre as duas regiões dos blocos infiltrantes. Observou-se então que a expressão negativa predominou na margem de invasão (96%) adjacente ao estroma em relação à área central (83%) dos ninhos infiltrantes diferença, contudo, sem significância estatística ($p = 0,3463$). Esta também foi a conclusão de Rodrigues *et al.*, (2013), em investigação semelhante em carcinomas de vulva, quando observaram que a diferença de expressão de caderina-E entre a área central (54%) e a margem de invasão (51,7%) não foi significativa ($p = 0,692$).

Em síntese, esta pesquisa mostrou que a caderina-E é expressa frequentemente na membrana celular no epitélio normal adjacente às cervicites. Notou-se, também, que há perda progressiva de caderina-E, nas LIEs de baixo e alto graus, que prepondera nas células menos diferenciadas, no terço basal da espessura epitelial. Finalmente, observou-se que a mais significativa expressão negativa da caderina-E ocorreu no carcinoma epidermóide invasor do colo do útero.

Estes dados sugerem que a caderina-E pode desempenhar um papel importante na carcinogênese do colo uterino, no entanto, muitos aspectos permanecem sem explicação e novos estudos são necessários para aquisição de maiores conhecimentos sobre esta molécula de adesão. O conjunto destes aspectos motivou a realização deste estudo.

6. CONCLUSÕES

- A cervicite mostrou forte expressão membranar de caderina-E que se apresentou diminuída nas LIEs e com perda acentuada no carcinoma invasor.
- Nas cervicites, a imunomarcção da caderina-E não exibiu diferenças ao se comparar sua expressão nas regiões histológicas da ectocérvice com a da JEC/metaplasia, porém mostrou nítido predomínio de expressão positiva no terço intermediário quando comparado aos demais estratos epiteliais (terços, basal e superficial).
- A comparação entre a expressão da caderina-E nas LIEs propriamente ditas e nas áreas de mucosa normal adjacente a estas, não resultou em diferença significativa.
- Nas LIEs não houve diferenças significantes de marcação da caderina-E entre as regiões histológicas ectocérvice e JEC/metaplasia, porém nas camadas de estratificação, observou-se predomínio de marcação positiva no terço intermediário quando comparado aos terços, basal e superficial da espessura epitelial.
- A imunoexpressão negativa da caderina-E é indiscutivelmente mais pronunciada nos carcinomas escamosos invasores do colo uterino quando comparados às LIEBGs e às LIEAGs.
- A expressão da caderina-E nas diferentes regiões dos blocos infiltrantes (região marginal e região central) não mostrou diferença significativa.

REFERÊNCIAS

- ACLOQUE, H.; ADAMS, M. S.; FISHWICK, K. BRONNER-FRASER, M.; NIETO, M. A. Epithelial – Mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, p. 1438-1449, 2009.
- ADEGBOYEGA, P. A. Viruses and Cancer. **African Journal of Clinical and Experimental Microbiology**, v. 13, p. 1-27, 2012.
- ALMEIDA, P. R.; FERREIRA, V. A.; SANTOS, C. C. ROCHA-FILHO, F. D.; FEITOSA, R. R.; FALCÃO, E. A. A.; CAVADA, B. K.; RIBEIRO, R. A. E-cadherin immunoexpression patterns in the characterisation of gastric carcinoma histotypes. **Journal of Clinical Pathology**, v. 63, p. 635-639, 2010.
- AI MOUSTAFA, A.-E.; KASSAB, A.; DARNEL, A.; YASMEEN, A. High-Risk HPV/ErbB-2 Interaction on E-Cadherin/Catenin Regulation in Human Carcinogenesis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 2159-2172, 2008.
- APGAR, B. S.; ZOSCHNICK, L.; WRIGHT JUNIOR, T. C. The 2001 Bethesda System Terminology. **American Family Physician**, v. 68, p. 1992-1998, 2003.
- ARIZTIA, E. V.; LEE, C. J.; GOGOI, R.; FISHMAN, D. A. The Tumor Microenvironment: Key to Early Detection. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 43, p. 393-425, 2006.
- BASEMAN, J. G.; KOUTSKY, L. A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 32S, p. S16-S24, 2005.
- BAUM, B.; SETTEMAN, J.; QUINLAN, M. P. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. **Seminars in Cell & Development Biology**, v. 19, p. 294-308, 2008.
- BEHRENS, J.; MAREEL, M. M.; VAN ROY, F. M.; BIRCHMEIER, W. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. **J Cell Biol.** v. 108, p. 2435-2447, 1989.
- BOGENRIEDER, T; HERLYN, M. Axis of evil: Molecular mechanisms of cancer metastasis. **Oncogene**, v. 22, p. 6524-6536, 2003.
- BUCKLEY, C. H.; BUTLER, E. B.; FOX, H. Cervical intraepithelial neoplasia. **Journal of Clinical Pathology**, v. 35, p. 1-13, 1982.
- BUITRAGO-PÉREZ, A.; GARAULET, G.; VÁSQUEZ-CARBALLO, A.; PARAMIO, J. M.; GARCIA-ESCUADERO, R. Molecular Signature of HPV-Induced Carcinogenesis: pRb, p53 and Gene Expression Profiling. **Current Genomics**, v. 10, p. 26-34, 2009.
- CABERG, J.- H. D.; HUBERT, P. M.; BEGON, D. Y.; HERFS, M. F.; RONCARATI, P. J.; BONIVER, J.; DELVENNE, P. O. Silencing of E7 oncogene restores functional E-cadherin

expression in human papillomavirus 16-transformed keratinocytes. **Carcinogenesis**, v. 29, p. 1441-1447, 2008.

CABRIJAN, L.; LIPOZENCIC, J. Adhesion molecules in keratinocytes. **Clinics in Dermatology**, v. 29, p. 427-431, 2011.

CAHILL, D. P.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B.; LENGAUER, C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. **Trends in Cell Biology**, v. 9, p. M57-M60, 1999.

CARCOPINO, X.; HENRY, M.; OLIVE, D.; BOUBLI, L.; TAMALET, C. Détection et quantification des infections génitales à papillomavirus humains: conséquences virologiques, épidémiologiques et cliniques. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 41, p. 68-79, 2011.

CARTER, J. R.; DING, Z.; ROSE, B. R. HPV infection and cervical disease: A review. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 51, p. 103-108, 2011.

CARVALHO, A. C.; KOWALSKI, L. P.; FRÓES-MARQUES-CAMPOS, A. H. J.; SOARES, A. S.; CARVALHO, A. L.; VETTORE, A. L. Clinical significance of molecular alterations in histologically negative surgical margins of head and neck cancer patients. **Oral Oncology**, v. 48, p. 240-248, 2012.

CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion and signaling by Cadherins and Ig-Cams in Cancer. **Nature Reviews**, v. 4, p. 118-132, 2004.

CHO, S. B.; LEE, K. H.; LEE, J. H.; PARK, S. Y.; LEE, W. S.; PARK C. H.; KIM, H. S.; CHOI, S. K.; REW, J. S. Expression of E- and N-cadherin and clinicopathology in hepatocellular carcinoma. **Pathology International**, v. 58, p. 635-642, 2008.

DARRAGH, T. M.; COLGAN, T. J.; COX, J. T.; HELLER, D. S.; HENRY, M. R.; LUFF, R. D.; MCCALMONT, T.; NAYAR, R.; PALEFSKY, J. M.; STOLER, M. H.; WILKINSON, E. J.; ZAINO, R. J.; WILBUR, D. C. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: Background and Consensus Recommendations from The College of American Pathologists and American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 136, p. 1266-1297, 2012.

De BOER, C. J.; Van DORST, E.; Van KRIEKEN, H.; Van RHIJIN, C. M. J.; WARNAAR, S. O.; FLEUREN, G. J.; LITVINOV, S. V. Changing Roles of Cadherins and Catenins during Progression of Squamous Intraepithelial Lesions in the Uterine Cervix. **American Journal of Pathology**, v. 155, p. 505-515, 1999.

DELVENNE, P.; HUBERT, P.; JACOBS, N. Epithelial metaplasia: an inadequate environment for antitumour immunity? **Trends in Immunology**, v. 25, p. 169-173, 2004.

De VILLIERS, E.-M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H.-U.; Zur HAUSEN. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17-27, 2004.

DOEBERITZ, M. K. New markers for cervical dysplasia to visualize the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. **European Journal of Cancer**, v. 38, p. 2229-2242, 2002.

DÜRST, M.; GISSMANN, L.; IKENBERG, H.; zur HAUSEN, H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, p. 3812-3815, 1983.

EGEBLAD, M.; RASCH, M. G.; WEAVER, V. M. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, p. 697-706, 2010.

FRANCO, E. L. Cancer Causes Revisited: Human Papillomavirus and Cervical Neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, p. 779-780, 1995.

FRANCO, E. L.; HARPER, D. M. Vaccination against human papillomavirus infection: A new paradigm in cervical cancer control. **Vaccine**, v. 23, p. 2388-2394, 2005.

GIANNINI, S. L.; HUBERT, P.; DOYEN, J.; BONIVER, J.; DELVENNE, P. Influence of the Mucosal Epithelium Microenvironment on Langerhans Cells: Implications for the Development of Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix. **International journal of Cancer**, v. 97, p. 654-659, 2002.

GIBSON, N. J. Cell adhesion molecules in context: CAM function depends on the neighborhood. **Cell Adhesion & Migration**, v. 5, p. 48-51, 2011.

GLOBOCAN. Cervical Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>>. Acesso em: 05 set. 2013.

GOVAN, A. D. T.; HAINES, R. M.; LANGLEY, F. A.; TAYLOR, C. W.; WOODCOCK, A. S. The histology and cytology of changes in the epithelium of the cervix uteri. **Journal of Clinical Pathology**, v. 22, p. 383-395, 1969.

GOVINDAPPAGARI, S.; SCHIAVONE, M. B.; WRIGHT, J. D. Cervical Neoplasia. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 54, p. 528-536, 2011.

GRAVITT, P. E.; The known unknowns of HPV natural history. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, p. 4593-4599, 2011.

GUIDO, R. Human Papillomavirus and Cervical Disease in Adolescents. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 51, p. 290-305, 2008.

GUIDO, R.; SCHIFFMAN, M.; SOLOMON, D.; BURKE, L. Postcolposcopy management strategies for women referred with low-grade squamous intraepithelial lesions or human papillomavirus DNA-positive atypical squamous cells of undetermined significance: A two-year prospective study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 188, p. 1401-1405, 2003.

HAGA, T.; UCHIDE, N.; TUGIZOV, S.; PALEFSKY, J. M. Role of E-cadherin in the induction of apoptosis of HPV16-positive CaSki cervical cancer cells during multicellular tumor spheroid formation. **Apoptosis**, v. 13, p. 97-108, 2008.

HAMMES, L. S.; TEKMAL, R. R.; NAUD, P.; EDELWEISS, M. I.; KIRMA, N.; VALENTE, P. T.; SYRJÄNEN, K. J.; CUNHA-FILHO, J. S. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression – Clinicopathological correlation. **Gynecologic Oncology**, v. 105, p. 157-165, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A.; The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HAY, E. D.; The Mesenchymal Cell, Its Role in the Embryo, and the Remarkable Signaling Mechanisms That Create It; **Developmental Dynamics**, v. 233, p. 706 – 720, 2005.

HELLNER, K.; MAR, J.; FANG, F.; QUACKENBUSH, J.; MÜNGER, K. HPV16 E7 oncogene expression in normal human epithelial cells causes molecular changes indicative of an epithelial to mesenchymal transition. **Virology**, v. 391, p. 57-63, 2009.

HUBERT, P.; CABERG, J.- H.; GILLES, C.; BOUSARGHIN, L.; FRANZEN-DETROOZ, E.; BONIVER, J.; DELVENNE, P. E-cadherin-dependent adhesion of dendritic and Langhans cells to keratinocytes is defective in cervical human papillomavirus-associated (pre)neoplastic lesions. **Journal of Pathology**, v. 206, p. 346-355, 2005.

HUNT, N. C. A.; DOUGLAS-JONES, A. G.; JASANI, B.; MORGAN, J. M.; PIGNATELLI, M. Loss of E-cadherin expression associated with lymph node metastases in small breast carcinomas. **Virchows Archiv**, v. 430, p. 285-289, 1997.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (RJ), 2011. Disponível em:< <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf> >. Acesso em: 27 jun. 2013.

JAWHARI, A.; JORDAN, S.; POOLE, S.; BROWNE, P.; PIGNATELLI, M.; FARTHING, M. J. G. Abnormal Immunoreactivity of the E-Cadherin-Catenin Complex in Gastric Carcinoma: Relationship with Patient Survival. **Gastroenterology**, v. 112, p. 46-54, 1997.

JEFFERS, M. D.; PAXTON, J.; BOLGER, B.; RICHMOND, J. A.; KENNEDY, J. H.; McNICOL, A. M. E-Cadherin and Integrin Cell Adhesion Molecule Expression in Invasive and *in situ* Carcinoma of the Cervix. **Gynecologic Oncology**, v. 64, p. 481-486, 1997.

JODELE, S.; BLAVIER, L.; YOON, J. M.; DeCLERC, Y. A. Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, p. 35-43, 2006.

KALLURI, R. EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, p. 1417-1419, 2009.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A.; The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, p. 1420-1428, 2009.

KATTO, J.; MAHLKNECHT, U. Epigenetic regulation of cellular adhesion in cancer. **Carcinogenesis**, v. 32, p. 1414-1418, 2011.

KIVIAT, N. Natural history of cervical neoplasia: Overview and update. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 175, p. 1099-1104, 1996.

KLAUSNER, R. D. The fabric of cancer cell biology – Weaving together the strands. **Cancer Cell**, v. 1, p. 3-10, 2002.

KOSHIOL, J.; LINDSAY, L.; PIMENTA, J. M.; POOLE, C.; JENKINS, D.; SMITH, J. S. Persistent Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis. **American Journal of Epidemiology**, v. 168, p. 123-137, 2008.

KOSS, L. G., The New Bethesda System for Reporting Results of Smears of the Uterine Cervix. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, p. 988-991, 1990.

LAURSON, J.; KHAN, S.; CHUNG, R.; CROSS, K.; RAJ, K. Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 918-926, 2010.

Le BITOUX, M. A.; STAMENKOVIC, I. Tumor host interactions: the role of the inflammation. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 130, p. 1079-1090, 2008.

LEE, J. M.; DEDHAR, S.; KALLURI, R.; THOMPSON, E. W.; The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development and disease. **The Journal of Cell Biology**, v. 172, p. 973-981, 2006.

LEE, M.-Y; CHOU, C.-Y; TANG, M.-T; SHEN, M.-R. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cervical Cancer: Correlation with Tumor Progression, Epidermal Growth Factor Receptor Overexpression, and Snail Up-Regulation. **Clinical Cancer Research**, v. 14, p. 4743-4750, 2008.

LEE, M.-Y.; SHEN, M. R.; Epithelial-Mesenchymal transition in cervical carcinoma. **American Journal of Translational Research**, v. 4, p. 1-13, 2012.

LEONG, C.-M; DOORBAR, J.; NINDL, I.; YOON, H.-S; HIBMA, M. H. Deregulation of E-cadherin by human papillomavirus is not confined to high-risk, cancer-causing types. **British Journal of Dermatology**, v. 163, p. 1253-1263, 2010

LIBRA, M.; SCALISI, A.; VELLA, N.; CLEMENTI, S.; SORIO, R.; STIVALA, F.; SPANDIDOS, D. A.; MAZZARINO, C. Uterine Cervical Carcinoma: Role of Matrix Metalloproteinases (Review). **International Journal of Oncology**, v. 34, p. 897-903, 2009.

LINDSTRÖM, A. K.; STENDAHL, U.; TOT, T.; LINDSTRÖM, B.; HELLBERG, D. Predicting the Outcome of Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix Using Combinations of Individual Tumor Marker Expressions. **Anticancer Research**, v. 27, p. 1609-1616, 2007.

LITTLEPAGE, L. E.; EGEBLAD, M.; WERB, Z. Coevolution of cancer and stromal cellular responses. **Cancer Cell**, v. 7, p. 499-500, 2005.

LORUSSO, G.; RÜEGG, C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 130, p. 1091-1103, 2008.

LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The Extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. **The Journal of Cell Biology**, v. 196, p. 395-406, 2012.

MAGALDI, T. G.; ALMSTEAD, L. L.; BELLONE, S.; PREVATT, E. G.; SANTIN, A. D.; DiMAIO, D. Primary human cervical carcinoma cells require human papillomavirus E6 and E7 expression for ongoing proliferation. **Virology**, v. 422, p. 114-124, 2012.

MAKRILIA, N.; KOLLIAS, A.; MANOLOPOULOS, L.; SYRIGOS, K. Cell adhesion molecules: Role and Clinical Significance in Cancer. **Cancer Investigation**, v. 27, p. 1023-1037, 2009.

MALUMBRES, M. Oncogene-Induced Mitotic Stress: p53 and pRb Get Mad Too, **Cancer Cell**, v. 19, p. 691-692, 2011.

MATTHEWS, K.; LEONG, C.-M.; BAXTER, L.; INGLIS, E.; YUN, K.; BÄCKSTRÖM, B. T.; DOORBAR, J.; HIBMA, M. Depletion of Langerhans Cells in Human Papillomavirus Type 16-Infected Skin Is Associated with E6-Mediated Down Regulation of E-Cadherin. **Journal of Virology**, v. 77, p. 8378-8385, 2003.

MEIJER, C. J. L. M.; SNIJDERS, J. F.; VAN DEN BRULE, A. J. C. Screening for cervical cancer: Should we test for infection with high-risk HPV? **Canadian Medical Association Journal**, v. 163, p. 535-538, 2000.

MEIJER, C. J.; SNIJDERS, P. J.; CASTLE, P. E.; Clinical utility of HPV genotyping. **Gynecologic Oncology**, v. 103, p. 12-17, 2006.

MÉNDEZ, M. T.; BOSCH, A. L. Abnormal Immunoexpression of Cell Adhesion Molecules (CAMs) in Cervical Cancer. **International Journal of Surgical Pathology**, v. 19, p. 733-742, 2011.

MICALIZZI, D. S.; FARABAUGH, S. M.; FORD, H. L.; Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, p. 117-134, 2010.

MOSCICKI, A. B.; SHIBOSKI, S.; HILLS, N.; POWELL, K. J.; JAY, N.; HANSON, E. N.; MILLER, S.; CANJURA-CLAYTON, L. K.; FARHAT, S.; BROERING, J. M.; DARRAGH, T. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. **Lancet**, v. 364, p. 1678-1683, 2004.

MÜNGER, K.; BALDWIN, A.; EDWARDS, K. M.; HAYAKAWA, H.; NGUYEN, C. L.; OWENS, M.; GRACE, M.; HUH, K. Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. **Journal of Virology**, v. 78, p. 11451-11460, 2004.

MUNHOZ, N. G.; RODRIGUES, D. A.; PEDREGOSA, J. F.; RODRIGUES, J. O.; JUNQUEIRA, M. S. G.; YONAMINE, P. T. K.; PEREIRA, S. F.; UEZATO, S.; PANDOSSIO, T.; MARTINS, E. K. L.; De OLIVEIRA, F. B.; CORDEIRO, J. A.;

BONILHA, J. L.; CURY, P. M. The Use of Molecular Markers (p16, Ki-67 and E-Cadherin) in uterine Cervical Biopsies. **The Open Pathology Journal**, v. 3, p. 10-17, 2009.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, J. F.; MEIJER, J. L. M. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus types Associated with Cervical Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 518-527, 2003.

NARISAWA-SAITO, M.; KIYONO, T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Role of E6 and E7 proteins. **Cancer Science**, v. 98, p. 1505-1511, 2007.

NATALWALA, A.; SPYCHAL, R.; TSELEPIS, C. Epithelial-mesenchymal transition mediated tumorigenesis in the gastrointestinal tract. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, p. 3792-3797, 2008.

ORLANDO, P.A.; GATENBY, R. A.; GIULIANO, A. R.; BROWN, J. S. Evolutionary Ecology of Human Papillomavirus: Trade-offs, Coexistence, and origins of High-Risk and Low-Risk Types. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, p. 272-279, 2012.

OZAKI, S.; ZEN, Y.; INOUE, M. Biomarker expression in cervical intraepithelial neoplasia: potential progression predictive factors for low grade lesions. **Human Pathology**, v. 42, p. 1007-1012, 2011.

ÖZBEK, S.; BALASUBRAMANIAN, P. G.; CHIQUET-EHRISMANN, R.; TUCKER, R. P.; ADAMS, J. C. The Evolution of Extracellular Matrix. **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, p. 4300-4305, 2010.

PAPADAVID, E.; PIGNATELLI, M.; ZAKYNTHINOS, S.; KRAUSZ, T.; CHU, A. C. Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin/catenin (α -, β - and γ -) complex in premalignant and malignant non-melanocytic skin tumours. **Journal of Pathology**, v. 196, p. 154-162, 2002.

PARSONS, J. T.; HORWITZ, A. R.; SCHWARTZ, M. A. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, p. 633-643, 2010.

PIJNENBORG, R.; DIXON, G.; ROBERTSON, W. B.; BROSENS, I. Trophoblastic Invasion of Human Decidua From 8 to 18 Weeks of Pregnancy. **Placenta**, v. 1, p. 3-19, 1980.

PSAILA, B.; LYDEN, D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. **Nature Reviews - Cancer**, v. 9, p. 285-293, 2009.

RADISKY, E. S.; RADISKY, D. C. Matrix Metalloproteinase-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, p. 201-212, 2010.

REAGAN, J. W.; SEIDMANN, I. L.; SARACUSA, Y. The Cellular Morphology of Carcinoma *in situ* and Dysplasia or Atypical Hyperplasia Of The Uterine Cervix. **Cancer**, v. 6, p. 224-235, 1953.

REN, G.; ROBERTS, A. I.; SHI, Y. Adhesion Molecules: Key players in Mesenchymal stem cells-mediated immunosuppression. **Cell Adhesion & Migration**, v. 5, p. 20-22, 2011.

RENDÓN, F. E. T. Lésion premaligna escamosa del cuello uterino, um enfoque actualizado. **Patologia Revista latinoamericana**, v. 46, p. 332-342, 2008.

RICHART, R. M. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 10, p. 748-784, 1967.

RIGONI-STERN, D. Fatti statistici relativi alle malattie cancerose che servono di base alle poche cose dette dal dottore Rigoni-Stern. **Giornale per Servire ai Progressi della Patologia e della Terapeutica**, serie 2, v. 2, p. 507-517, 1842.

RODRIGUES, I. S.; LAVORATO-ROCHA, A. M.; MAIA, B. de M.; STIEPCICH, M. M. A.; CARVALHO, F. M.; BAIOSCHI, G.; SOARES, F. A.; ROCHA, R. M. Epithelial-mesenchymal transition-like events in vulvar câncer and its relation with HPV. **British Journal of Cancer**, v. 109, p. 184-194, 2013.

RODRIGUEZ, A. C.; SCHIFFMAN, M.; HERRERO, R.; HILDESHEIM, A.; BRATTI, C.; SHERMAN, M. E.; SOLOMON, D.; GUILLEN, D.; ALFARO, M.; MORALES, J.; HUTCHINSON, M.; KATKI, H.; CHEUNG, L.; WACHOLDER, S.; BURK, R. D. Longitudinal Study of Human Papillomavirus Persistence and Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2/3: Critical Role of Duration of Infection. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, p. 315-324, 2010.

RODRÍGUEZ-SASTRE, M. A.; GONZÁLEZ-MAYA, L.; DELGADO, R.; LIZANO, M.; TSUBAKI, G.; MOHAR, A.; GARCIA-CARRANCA, A. Abnormal distribution of E-cadherin and β -catenin in different histologic types of cancer of the uterine cervix. **Gynecologic Oncology**, v. 97, p. 330-336, 2005.

ROWLANDS, T. M.; SYMONDS, J. M.; FAROOKHI, R.; BLASCHUK, O. W. Cadherins: crucial regulators of structure and function in reproductive tissues. **Reviews of Reproduction**, v. 5, p. 53-61, 2000.

SHIMAZUI, T.; KOJIMA, T.; ONOZAWA, M.; SUZUKI, M.; ASANO, T.; AKASA, H. Expression profile of N-cadherin differs from other classical cadherins as a prognostic marker in renal carcinoma. **Oncology Reports**, v. 15, p. 1181-1184, 2006.

SLAUGHTER, D. P.; SOUTHWICK, H. W.; SMEJCAL, W. "Field Cancerization" In Oral Stratified Squamous Epithelium. **Cancer**, v. 6, p. 963-968, 1953.

SNIJDERS, P. J. F.; STEENBERGEN, R. D. M.; HEIDEMAN, D. A. M.; MEIJER, C. J. L. M. HPV-mediated carcinogenesis: concepts and clinical implications. **Journal of Pathology**, v. 208, p. 152-164, 2006.

SOLOMON, D.; DAVEY, D.; KURMAN, R.; MORIARTY, A.; O'CONNOR, D.; PREY, M.; RAAB, S.; SHERMAN, M.; WILBUR, D.; WRIGHT JUNIOR, T.; YOUNG, N. The 2001 Bethesda System: Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. **The Journal of the American Medical Association**, v. 287, p. 2114-2119, 2002.

SOONTHORNTHUM, T.; ARIAS-PULIDO, H.; JOSTE, N.; LOMO, L.; MULLER, C.; RUTLEDGE, T.; VERSCHRAEGEN, C. Epidermal Growth factor receptor as a biomarker for cervical cancer. **Annals of Oncology**, v. 22, p. 2166-2178, 2011.

STERN, E. Cytohistopathology of Cervical Cancer. **Cancer Research**, v. 33, p. 1368-1378, 1973.

SZALMÁS, A.; KÓNYA, J. Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 19, p. 144-152, 2009.

TAYLOR, C. R. Standardization in immunohistochemistry: the role of antigen retrieval in molecular morphology. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 81, p. 3-12, 2006.

THIERY, J. P. Epithelial-Mesenchymal Transitions In Tumour Progression. **Nature Reviews**, v. 2, p. 442-454, 2002.

THIERY, J. P.; ACLOQUE, H.; HUANG, R. Y. J.; NIETO, A. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. **Cell**, v. 139, p. 871-890, 2009.

THIERY, J. P.; SLEEMAN, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transition. **Nature Reviews**, v. 7, p. 131 – 142, 2006.

THOMISON III, J.; THOMAS, L. K.; SHROYER, K. R. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. **Human Pathology**, v. 39, p. 154-166, 2008.

VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Roles for microRNAs in the regulation of cell adhesion molecules. **Journal of Cell Science**, v. 124, p. 999-1006, 2011.

VAN ROY, F.; BERX, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 3756-3788, 2008.

VAZQUEZ-MENA, O.; MEDINA-MARTINEZ, I.; JUÁREZ-TORRES, E.; BARRÓN, V.; ESPINOSA, A.; VILLEGAS-SEPULVEDA, N.; GÓMEZ-LAGUNA, L.; NIETO-MARTINEZ, K.; OROZCO, L.; ROMAN-BASAURE, E.; CORTEZ, S. M.; IBANEZ, M. B.; VENEGAS-VEGA, C.; GUARDADO-ESTRADA, M.; RANGEL-LÓPEZ, A.; KOFMAN, S.; BERUMEN, J. Amplified Genes May Be Overexpressed, Unchanged, Or Downregulated In Cervical Cancer Cell Lines. **PLoS One**, v. 7, p. e32667, 2012.

WALBOOMERS, J. M. .; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J. F.; PETO, J.; MEIJER, C. J. L. M.; MUNOZ, N. Human Papillomavirus is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide. **Journal of Pathology**, v. 189, p. 12-19, 1999.

WAXMAN, A. G.; CHELMOW; D.; DARRAGH, T. M.; LAWSON, H.; MOSCICKI, A. B. Revised Terminology for Cervical Histopathology and Its Implications for Management of High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix. **Obstetrics & Gynecology**, v. 120, p. 1465-1471, 2012.

WU, Y.; ZHOU, B. P. New insights of the epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 40, p. 643-650, 2008.

ZEISBERG, M.; NEILSON, E. G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, p. 1429-1437, 2009.

ZHAN, D.,Q.;WEI, S.; LIU, C.; LIANG, B. Y.; JI, G. B.; CHEN, X. P.; XIONG, M.; HUANG, Z. Y. Reduced N-cadherin expression is associated with metastatic potential and poor surgical outcomes of hepatocellular carcinoma. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 27, p. 173-180, 2012.

ZHONG, X.; RESCORLA, F. J. Cell surface adhesion molecules and adhesion-initiated signaling: Understanding of anoikis resistance mechanisms and therapeutic opportunities. **Cellular Signaling**, v. 24, p. 393-401, 2012.

ZHOU, J.; PENG, C.; LI, B.; WANG, F.; ZHOU, C.; HONG, D.; YE, F.; CHENG, X.; LÜ, W.; XIE, X. Transcriptional gene silencing of HPV16 E6/E7 induces growth inhibition via apoptosis in vitro and in vivo. **Gynecologic Oncology**, v. 124, p. 296-302, 2012.

ZIMMERMANN, J. B.; GOBBI, H.; MARTINS-ALVES, M. J.; MELO, V. H. Existe alteração no mecanismo de adesão celular mediado pela E-caderina nas neoplasias cervicais de pacientes soropositivas para o HIV? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, p. 286-292, 2010.

Zur HAUSEN, H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1288, p. F55-F78, 1996.

Zur HAUSEN, H. Papillomaviruses and Cancer: From Basic Studies to Clinical Application, **Nature**, v. 2, p. 342-350, 2002.

APÊNDICE - Quadro Geral da Imunoexpressão de Caderina-E nas Cervicites, LIEBGs, LIEAGs e no Carcinoma Invasor do Colo uterino

Caso	Idade	Cervicite		LIEBG		LIEAG		Carcinoma Invasor	
		+	-	+	-	+	-	+	-
01	19	x							
02	25	x							
03	20	x							
04	24		x						
05	43	x							
06	28	x							
07	24	x							
08	19	x							
09	40			x					
10	35			x					
11	29				x				
12	36				x				
13	29			x					
14	20				x				
15	28			x					
16	21				x				
17	22			x					
18	37			x					
19	38			x					
20	22			x					
21	29			x					
22	43				x				
23	31			x					
24	28				x				
25	20			x					
26	26			x					
27	34			x					
28	21			x					
29	23			x					
30	38			x					
31	28			x					
32	22				x				
33	26					x			
34	35						x		
35	66						x		
36	29					x			
37	53						x		
38	43					x			
39	53					x			
40	28					x			
41	44					x			
42	39					x			

