



**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**METALOPROTEINASES DE MATRIZ E SEUS MODULADORES
INDUZIDOS NA INFECÇÃO PELO HPV *IN SITU* E *IN VITRO***

Natália Pereira da Rocha

**Rio de Janeiro
Outubro de 2018**



**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**METALOPROTEINASES DE MATRIZ E SEUS MODULADORES
INDUZIDOS NA INFECÇÃO PELO HPV *IN SITU* E *IN VITRO***

Natália Pereira da Rocha

**Rio de Janeiro
Outubro de 2018**



**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**METALOPROTEINASES DE MATRIZ E SEUS MODULADORES
INDUZIDOS NA INFECÇÃO PELO HPV *IN SITU* E *IN VITRO***

Natália Pereira da Rocha

Tese apresentada à Pós-
graduação em Pesquisa
Aplicada à Saúde da Criança e
da Mulher, como pré-requisito
para a obtenção do título de
Doutor em Ciências

Orientadores: Dr. Fábio Russomano
Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida

**Rio de Janeiro
Outubro de 2018**

CIP - Catalogação na Publicação

da Rocha, Natália Pereira.

METALOPROTEINASES DE MATRIZ E SEUS MODULADORES
INDUZIDOS NA INFECÇÃO PELO HPV IN SITU E IN VITRO / Natália Pereira
da Rocha. - Rio de Janeiro, 2018.

150 f.; il.

Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro - RJ, 2018.

Orientador: Fábio Bastos Russomano.

Co-orientadora: Maria da Glória Bonecini Almeida.

Bibliografia: f. 85-106

1. HPV. 2. TNF-alfa. 3. Metaloproteínas de matriz. 4. Lesões cervicais.
I. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Augusto Rocha e Eliane Pereira, por tudo que fizeram por mim até hoje, pelo amor, carinho, dedicação, atenção e incentivo em todas as etapas da minha vida, tanto pessoal, quanto profissional. Não há palavras que possam descrever isso e muito menos meu amor e agradecimento por TUDO!

Ao meu irmão, Roberto Rocha, que sempre foi um exemplo pra mim, pela amizade, pelas conversas, pelos conselhos, e pelo apoio, sempre querendo o melhor pra mim!

À orientadora, Dra Maria da Glória Bonecini, por ter me recebido no laboratório na iniciação científica, me mostrando o que é pesquisa e desde então, ter acreditado na minha capacidade me mantendo em sua equipe por 10 anos.

Ao orientador Dr. Fábio Russomano por toda ajuda e contribuição no contexto clínico, desde a minha iniciação científica, e por ter aceitado fazer parte deste trabalho.

À Dra Yara Furtado, do Ambulatório de Patologia Cervical do Instituto de Ginecologia (UFRJ), por ter aceitado participar deste trabalho e ajudar na inclusão de amostras de pacientes com lesão de colo uterino, assim como toda a equipe de médicos e residentes do ambulatório.

Ao Dr. Roberto Lima, do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Moncorvo Filho, pela ajuda com os laudos e seleção dos blocos parafinados das pacientes incluídas neste trabalho.

À Dra Elyzabeth Avvad, Nilma e Viviane, da Coordenação Diagnóstica de Anatomia Patológica do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, da Fundação Oswaldo Cruz (IFF/Fiocruz), e à Dra Janice, e aos técnicos Marquinho e Francisco, do Serviço de Anatomia Patológica do Instituto Nacional de Infectologia da Fiocruz (INI/Fiocruz), pela fundamental ajuda nos cortes dos materiais parafinados para as análises realizadas neste trabalho.

À Dra. Juliana Lauar, por ter aceitado participar da avaliação do presente estudo.

À grande amiga Ana Teresa Fernandes, por todo incentivo, apoio, paciência, companheirismo, ensinamentos, broncas, brincadeiras, por todas as vezes que me levantou quando achei que fosse cair, pela confiança que depositou em mim, enfim...por tudo.

Em especial aos amigos Eric e Andreia, pelo apoio e ensinamentos nos experimentos e análises em que ainda não era familiarizada. Vocês fizeram uma enorme diferença na realização deste trabalho e em meu crescimento.

Aos demais membros da equipe do Laboratório de Imunologia e Imunogenética em Doenças Infecciosas, do INI/Fiocruz: Cynthia, Dóris, Gisele, Gabrielle e Yasmim, e aos que um dia fizeram parte: Monique, Larissa, Odete e Maria Clara por toda ajuda e pelos momentos de descontração, os quais foram muito importantes no dia a dia do laboratório.

Aos grandes amigos, Mônica Vieira, Ricardo França, Luã Cardoso pela amizade e companheirismo desde a faculdade até a pós-graduação. Torço por vocês.

Aos grandes amigos Tássia Alves, Carol Costa, Tay Fresiq, e Felipe Moraes, pela força, conversas, paciência nos momentos de estresse e ausência, pela torcida e a grande amizade. Vocês fizeram toda diferença.

Ao amigo e companheiro Jefferson Luiz por todas as vezes que acreditou em mim quando eu mesma duvidava que conseguiria. Pelo apoio de sempre e a grande amizade, acima de tudo.

Ao amigo canino e não menos importante, Ed, que chegou à minha vida de surpresa e se tornou o grande alívio dos meus dias difíceis.

E um agradecimento especial a todas as pacientes que aceitaram participar deste estudo, contribuindo, assim, para melhor compreensão a respeito da infecção pelo HPV.

“Ninguém baterá tão forte quanto a vida. Porém, não se trata de quão forte você pode bater, se trata de quão forte você pode ser atingido e continuar tentando. É assim que se consegue vencer!”

(Rocky Balboa)

Resumo

A infecção por HPV tem se tornado uma das infecções sexualmente transmissíveis mais prevalentes no mundo, sendo a causa primária do câncer cervical. O processo inflamatório cervical causado pelo HPV e subsequente desenvolvimento de lesões pre-malignas são induzidas direta ou indiretamente por um sistema complexo de interação entre oncogenes e fatores do hospedeiro, secretados por queratinócitos, células imunes e matriz extracelular (MEC). O desenvolvimento e modelamento da MEC pode ser regulado através da expressão de metaloproteinases (MMP), que tem sido associada a diversos tipos de tumores. Assim, no presente trabalho objetivamos identificar e associar as expressões de MMP -2, -7 e -9 e seus moduladores TIMP-2, EphA2, EfrinaA1 e TNF- α em lesões de colo uterino. Para isto, incluímos 30 mulheres com idades entre 24 e 57 anos. Destas, 15 apresentaram lesões de colo uterino de alto grau (HSIL) e 15 eram mulheres hysterectomizadas sem lesões associadas a infecção pelo HPV. Avaliamos a expressão das MMPs por imunohistoquímica no epitélio e estroma das amostras incluídas. Observamos um aumento de todas as MMPs e seus moduladores no estroma das lesões do grupo com HSIL comparados com o grupo controle, principalmente MMP-2, -9 e EphA2, reforçando papéis no processo de degradação e invasão. Desta forma, concluímos que MMP-2, MMP-9 e EphA2 possuem papel no desenvolvimento de lesões de alto grau. Além do trabalho *in vivo*, nosso estudo buscou avaliar o papel *in vitro* da citocina pró-inflamatória TNF- α na modulação da expressão das MMPs e seus moduladores em linhagens cervicais de queratinócitos infectados (HeLa) ou não (C33A) por HPV. Para tanto, avaliamos a expressão de RNAm destes marcadores por PCR em tempo real (qPCR). Observamos um aumento da expressão do RNAm destes marcadores, exceto MMP-9 e EphA2, em HeLa quando relacionados com a expressão em C33A, sugerindo que a presença do HPV de alto risco em HeLa possa estar influenciando na expressão gênica destes marcadores. Diante disto, concluímos que TNF- α possui papel modulador na expressão de RNAm das MMPs e seus moduladores, exceto EphA2, exclusivamente em linhagens de queratinócitos infectados pelo HPV.

Palavras-chave: HPV, TNF- α , metaloproteinases de matriz, lesões cervicais

Abstract

HPV infection has become one of the most prevalent sexually transmitted infections in the world, being the primary cause of cervical cancer. The HPV cervical inflammatory process and subsequent pre-malignant lesions development are induced directly or indirectly by a complex system of interaction between oncogenes and host factors, secreted by keratinocytes, immune cells and extracellular matrix (ECM). The ECM development and modeling can be regulated through the expression of metalloproteinases (MMP), which has been associated with several types of tumors. Thus, in the present work we aimed to identify and associate the MMP-2, -7 and -9 and their modulators TIMP-2, EphA2, EfrinaA1 and TNF- α expressions in cervical lesions. For this, we included 30 volunteers between the ages of 24 and 57 years. Of these, 15 presented with high grade cervical lesions (HSIL) and 15 were hysterectomized volunteers without HPV-associated lesions. We evaluated the MMPs expression by immunohistochemistry in the epithelium and stroma of the included samples. We observed an increase in all MMPs and their modulators in the stromal lesions of the HSIL group compared to the control group, mainly MMP-2, -9 and EphA2, reinforcing roles in the degradation and invasion process. In this way, we concluded that MMP-2, MMP-9 and EphA2 play a role in the outcome of high-grade lesions. In addition to *in vivo* work, our study aimed to evaluate the *in vitro* role of the proinflammatory cytokine TNF- α in modulating the MMPs expression and their modulators in cervical keratinocytes lineages infected (HeLa) or not (C33A) by HPV. For this, we evaluated the mRNA expression of these markers by real-time PCR (qPCR). We observed increased mRNA expression of these markers except MMP-9 and EphA2 in HeLa when related to C33A expression, suggesting that the presence of high-risk HPV in HeLa may be influencing the gene expression of these markers. We concluded that TNF- α modulated MMPs mRNA expression and its modulators, excepted by EphA2, only in HPV infected keratinocytes.

Key words: HPV, TNF- α , matrix metalloproteinase, cervical lesions

Lista de Figuras

Figura 1. Progressão oncogênica da lesão cervical.....	16
Figura 2. Replicação do HPV no epitélio cervical.....	18
Figura 3. Classificação das principais MMPs.....	33
Figura 4. Distribuição de células expressando MMP-2, -7 e -9 no colo uterino de mulher do grupo HSIL e controle.....	61
Figura 5. Distribuição de células expressando TIMP-2, EphA2, EfrinaA1 e TNF- α no colo uterino de mulher do grupo HSIL e controle.....	64
Figura 6. Correlação entre a expressão de MMPs e moduladores no epitélio e estroma em mulheres do grupo HSIL.....	65
Figura 7. Expressão de RNAm de <i>TNF-α</i> , <i>MMP-2</i> , -7 e -9 nas linhagens cervicais HeLa e C33A, avaliadas por qPCR, sob estímulo de TNF- α	67
Figura 8. Expressão de RNAm de <i>TIMP-2</i> , <i>EphA2</i> e <i>EfrinaA1</i> nas linhagens cervicais HeLa e C33A, avaliadas por qPCR, sob estímulo de TNF- α	69
Figura 9. Expressão relativa de RNAm de <i>TNF-α</i> , <i>MMP-2</i> , -7 e -9 nas linhagens cervicais HeLa e C33A, avaliadas por qPCR, sob estímulo de TNF- α	72
Figura 10. Expressão relativa de RNAm de <i>TIMP-2</i> , <i>EphA2</i> e <i>EfrinaA1</i> nas linhagens cervicais HeLa e C33A, avaliadas por qPCR, sob estímulo de TNF- α	73

Lista de Tabelas

Tabela 1: Anticorpos utilizados para avaliar a expressão <i>in situ</i> em amostras parafinadas.....	51
Tabela 2: <i>Primers</i> utilizados no qPCR para quantificar a expressão de RNAm em linhagens celulares.....	56

Lista de Abreviaturas

- ASCUS - *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance* (Células escamosas atípicas de significado indeterminado)
- E2F – *Transcription factor* (Fator de Transcrição)
- FADD – *Fas-associated death domain* (domínio de morte associado ao Fas)
- FGF – *Fibroblasts growth factor* (Fator de crescimento de fibroblastos)
- HPV – *Human Papilloma Virus* (Vírus do Papiloma Humano)
- HSIL - *High Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão intraepithelial de alto grau)
- IFN – Interferon
- IL – *Interleukin* (Interleucina)
- LCR - *Long Control Region* (região longa de controle)
- LPS – Lipopolissacarídeo
- LSIL - *Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão intraepithelial de baixo grau)
- MAT – Microambiente tumoral
- MEC - Matriz extracelular
- MMP – *Matrix metalloproteinases* (Matriz metalloproteinase)
- MT-MMP – Matriz metalloproteinase ligada à membrana
- NF κ B - *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (Fator de transcrição nuclear kappa B)
- NIC – Neoplasia Intra-epitelial Celular
- ORF - *Open Reading Frames* (Fase de leitura aberta)
- p53 – proteína 53
- PCR - *Polymerase Chain Reaction* (reação de polimerase em cadeia)
- pRb – proteína do retinoblastoma
- PAMP - *Pathogen-associated molecular patterns* (Padrão molecular associado ao patógeno)
- TACE - *Tumor necrosis factor- α -converting enzyme* (Enzima conversora do fator de necrose tumoral)
- TGF - *Transforming growth factor* (Fator de transformação do crescimento)
- TLR – *Toll-Like Receptor* (Receptores do tipo Toll)
- TNF – *Tumor necrosis factor* (Fator de necrose tumoral)
- TNFR - *TNF receptor* (receptor de TNF)
- TRADD - *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain* (Domínio de morte associado ao receptor-1 de TNF)
- VEGF - *Vascular endothelial growth factor* (Fator de crescimento endotelial vascular)
- VEGFR – *Vascular endothelial growth factor receptor* (Receptor do fator de crescimento endotelial vascular)

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	MARCO TEÓRICO.....	15
2.1	Papilomavírus Humano (HPV)	15
2.1.1	Infecção e ciclo replicativo do HPV.....	17
2.1.2	Evasão Imune.....	19
2.1.3	Epidemiologia do HPV e Câncer cervical.....	21
2.2	Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α).....	24
2.2.1	Aspectos gerais.....	24
2.2.2	TNF- α no desenvolvimento do câncer.....	25
2.2.3	TNF- α e a infecção por HPV.....	27
2.3	O Microambiente Tumoral.....	30
2.3.1	Matriz Extracelular (MEC)	31
2.4	Metaloproteinases de Matriz (MMP).....	32
2.4.1	Regulação e atividades das MMPs.....	34
2.4.2	O papel das MMPs no câncer.....	37
2.4.3	O papel das MMPs no câncer cervical	39
2.4.4	EphA2/EfrinaA1 e TNF- α como moduladores de MMPs e envolvimento na carcinogênese.....	41
3	JUSTIFICATIVA.....	46
4	OBJETIVOS.....	47
4.1	Objetivo Geral.....	47
4.2	Objetivos Específicos.....	47
5	METODOLOGIA.....	48
5.1	Presença de MMPs e seus reguladores em pacientes com lesões precursoras do câncer cervical.....	48
5.1.1	Seleção de pacientes.....	48
5.1.2	Expressão <i>in situ</i> das MMPs e seus moduladores.....	49

5.1.3 Análise estatística.....	51
5.2 Expressão de RNAm das MMPs e seus moduladores <i>in vitro</i> em linhagens de células cervicais.....	52
5.2.1 Cultivo das linhagens celulares e estimulação com TNF- α	52
5.2.2 Extração e purificação de RNA total.....	53
5.2.3 Síntese de cDNA (transcrição reversa).....	54
5.2.4 Quantificação da expressão gênica por qPCR.....	54
5.2.5 Análise Estatística.....	57
6 RESULTADOS.....	58
6.1 Casuística.....	58
6.2 Expressão de MMP-2, -7 e -9 no colo uterino.....	58
6.3 Expressão dos moduladores das MMPs, TIMP-2, EphA2, EfrinaA1 e TNF- α no colo uterino.....	61
6.4 Expressão de RNAm de <i>MMP-2, -9, -7, TNF-α, EphA2 e EfrinaA1</i> em linhagens cervicais.....	65
7 DISCUSSÃO.....	74
8 CONCLUSÕES.....	83
9 PERSPECTIVAS.....	84
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
11 ANEXOS.....	107
11.1 Manuscrito submetido à revista <i>Oncotarget</i>	107
11.2 Artigo publicado na revista <i>Apoptosis</i>	137
11.3 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	147
11.4 Carta de Anuência IG/UFRJ.....	150

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a prevalência da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) aumentou constantemente, se tornando uma das infecções sexualmente transmissíveis mais prevalentes no mundo, envolvendo tanto a população feminina como também a masculina, embora a prevalência seja maior em mulheres jovens e sexualmente ativas, sendo a causa primária do câncer cervical (CC) (1) e se tornando o quarto câncer mais comum entre mulheres em todo mundo (2).

Atualmente são conhecidos mais de 200 genótipos diferentes de HPV, onde 40 afetam o epitélio escamoso do trato anogenital e 15 são considerados oncogênicos. A infecção persistente pelos tipos oncogênicos deste vírus é o principal fator para o desenvolvimento do CC. Além disso, estes vírus são classificados em duas categorias de acordo com seu potencial oncogênico, como baixo risco, sendo os subtipos HPV6 e 11 os mais comuns, causando verrugas genitais/condilomas sem tendências de evolução para lesões malignas (3); e alto risco onde encontramos os subtipos HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 afetando o trato anogenital. Os subtipos HPV16 e 18 são os mais associados com o desenvolvimento do câncer, a partir da transformação das células normais em células oncogênicas sendo responsáveis por mais de 70% dos cânceres cervicais (4).

A infecção por HPV, embora muito frequente, é assintomática, latente e subclínica, e estudos já demonstraram uma elevada prevalência da presença de DNA-HPV em aproximadamente 11% de mulheres que apresentam citologia normal (5,6), destacando a importância das estratégias de rastreamento e controle do desenvolvimento do câncer cervical.

Ao longo da história, a terminologia das lesões escamosas associadas ao HPV que auxiliam o diagnóstico, sofreu mudanças, e frequentemente não considera o conhecimento atual da biologia e patogênese do vírus, dificultando a comunicação entre especialistas como patologistas, clínicos e pesquisadores. Atualmente, um sistema de nomenclatura histológica faz uso de biomarcadores que facilita essa comunicação entre os profissionais e melhoram a acurácia do diagnóstico (7). Neste contexto, para o diagnóstico diferencial de lesões pré-câncer (Neoplasia Intraepitelial Cervical – NIC – 2 e 3) e lesões que mimetizam pré-câncer (como metaplasias), é utilizado a marcação de p16, uma proteína supressora de tumor, como um biomarcador. Resultados positivos com uma expressão forte e difusa de p16 é indicativo de lesão pré-cancerígena; consequentemente, coloração negativa indica lesão de baixo grau (NIC 1) (7). Isso demonstra a importância da utilização de biomarcadores com valor prognóstico para o desenvolvimento do câncer. Da mesma forma, polimorfismos em genes relacionados à morte e ciclo celular (Bax, Bcl2 e p53), assim como relacionados à inflamação (TNF- α e seus receptores TNFR1 e 2) também são utilizados como biomarcadores de progressão de lesões para o câncer cervical, como já visto em nossos estudos prévios (artigos em anexo) (8,9).

Nos últimos anos, um dos fatores de prognóstico que tem gerado interesse é o aumento da expressão de metaloproteinases (MMPs) em tecidos tumorais. A alteração morfológica que caracteriza a transformação de uma NIC para um carcinoma invasivo é a ruptura focal e a descontinuidade da membrana basal, levando a um crescimento invasivo dependente da produção e distribuição alterada dessas MMPs (10). Contudo, vários mecanismos estão envolvidos na regulação da expressão das MMPs e, além disso, essas enzimas estão envolvidas na regulação de fatores de crescimento e seus receptores, tais como citocinas, quimiocinas, receptores de adesão e proteoglicanas de

superfície celular, além de uma variedade de outras enzimas (11). Nosso grupo vem estudando fatores imunológicos relacionados a carcinogênese (12) e, com este estudo, poderemos avaliar os mecanismos envolvidos na inflamação e o papel das MMPs como indutoras da carcinogênese cervical. Desta forma, nossa hipótese é que citocinas pro-inflamatórias, como o TNF- α , induzem o aumento da expressão das MMPs, nas lesões de alto grau comparadas ao colo do útero normal, e contribuem para a carcinogênese cervical durante a infecção pelo HPV.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. O PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

O HPV é um vírus não-envelopado, pertencente à família *Papillomaviridae*, formado por um capsídeo icosaédrico consistindo de 72 capsômeros, com DNA de dupla-fita, circular e com aproximadamente 8 mil pares de bases. O genoma do HPV é dividido em duas regiões, uma reguladora (LCR - *Long Control Region*) e a outra codificadora (ORF - *Open Reading Frames*). A região reguladora é caracterizada pela origem de replicação das partículas virais e pela transcrição. Já a região codificadora é ainda dividida em outras duas regiões, a precoce, conhecida como região E (do inglês, *early*) e a tardia, conhecida como região L (do inglês, *late*) (13). A região E contém cerca de seis genes, E1, E2, E4, E5, E6 e E7, sendo E1 e E2 atuando como fatores de replicação do DNA viral, transcrição e transformação da célula, e nos HPV's oncogênicos, as proteínas E4, E5, E6 e E7 modulam o ambiente para facilitar a replicação viral e evasão imune. A região L contém dois genes, os quais codificam proteínas do capsídeo viral, a L1 e a L2 (14,15).

Na década de 70, o HPV foi associado ao desenvolvimento de tumores cervicais e a partir daí renovou-se o interesse por este vírus, devido a evidências de uma provável relação com o câncer genital feminino, em especial do colo uterino (16), sendo conhecido atualmente como a principal causa de câncer no colo uterino.

O HPV possui tropismo pelo tecido epitelial, mas os diferentes tipos do HPV infectam regiões específicas. Alguns são mais prevalentes em lesões cutâneas enquanto outros são mais prevalentes em mucosas, especificamente do trato genital (17). Cerca de 30% das mulheres jovens se infectam com algum tipo de HPV oncogênico dentro de 24 meses após sua primeira relação sexual (18). Essas infecções podem resultar em anormalidades cervicais leves, porém, 90% delas se curam espontaneamente sem desenvolver sintomas dentro de 2 anos, em média,

podendo o vírus ser erradicado ou diminuído a um nível indetectável. O aparecimento de evidências clínicas é consequência do desenvolvimento de lesões de baixo ou alto grau, podendo se tornar uma infecção persistente com subtipos de HPV de alto risco (18,19). A terminologia Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), utilizada nas lesões cervicais, indica uma ampla gama de atipia celular limitada ao epitélio, podendo ser classificadas em diferentes níveis: NIC 1 (displasia leve), NIC 2 (displasia moderada) e NIC 3 (displasia grave e Carcinoma *In Situ*) com alta expressão das oncoproteínas E6 e E7 (20). Contudo, a classificação de Bethesda (1988, revisada em 1991 e 2001) reavaliou o comportamento das lesões, sendo criado o termo Lesão Intraepitelial Escamosa (SIL, do inglês *Squamous Intraepithelial Lesion*). Este sistema subdividiu as células epiteliais anormais em: AGC (células glandulares atípicas), ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado); LSIL (lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau) incluindo alterações condilomatosas (HPV) e NIC 1; HSIL (lesões intraepiteliais escamosas de alto grau) incluindo NIC 2 e 3 e carcinoma *in situ*; adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas (21).

A progressão de uma lesão de NIC 1 para uma NIC 2/3 e para CC é rara, podendo ocorrer em dois anos ou até mesmo levar décadas (22).

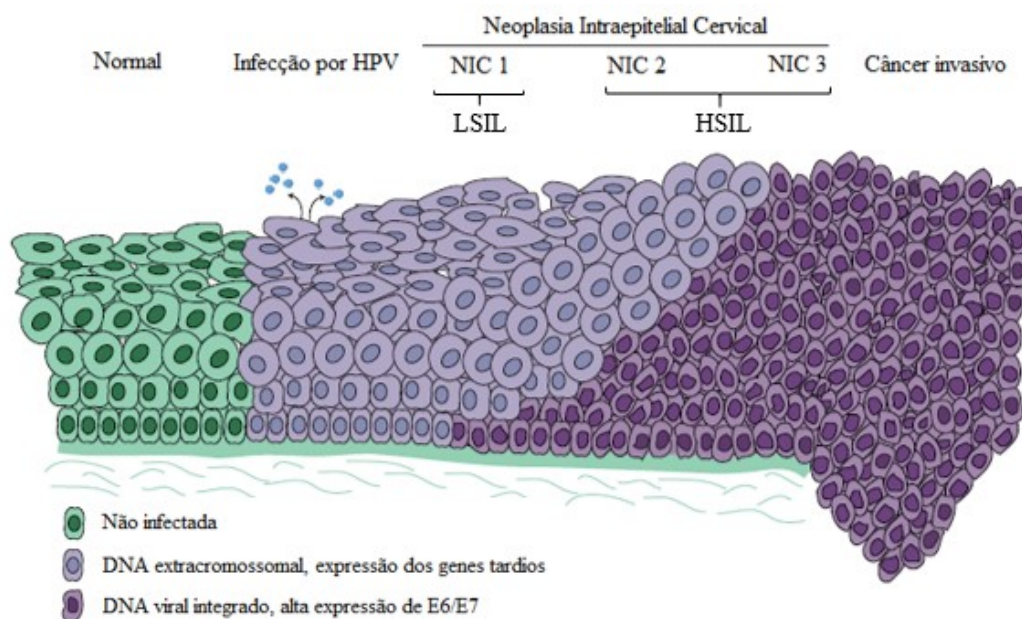


Figura 1: Progressão oncogênica da lesão cervical (Adaptado de McBride, 2017)

2.1.1 Infecção e ciclo replicativo do HPV

O HPV replica-se exclusivamente nas células epiteliais e é fortemente associado ao programa de diferenciação celular. A infecção ocorre quando o vírus penetra, através de microtraumas, na camada mais basal do epitélio escamoso estratificado, onde se encontram os queratinócitos, que são células indiferenciadas e possuem alta atividade mitótica. Uma vez no interior dos queratinócitos, as proteínas do capsídeo viral se desintegram e então o material genético do vírus fica retido em episomas, no interior do núcleo, o que é caracterizado pelo baixo número de cópias virais (23). A replicação do material genético do HPV ocorre durante o processo de diferenciação destas células, liberando as partículas virais no momento da descamação. A síntese de proteínas virais ocorre nos queratinócitos das camadas supra-basais, enquanto que a formação dos virions ocorre nas camadas mais superficiais, portanto, somente esses tipos celulares são capazes de sustentar a replicação do episoma viral (24). Essa estratégia de infectar células auto-renováveis e restringir os altos níveis de proteínas virais para a camada superficial da lesão permite sua persistência e fuga da vigilância imune. O ciclo celular pode durar até três semanas, pois este é o período para a completa diferenciação do queratinócito e sua escamação (3,15).

Para a replicação do genoma viral é necessária uma proteína iniciadora, a E1, que interage com diversos fatores de replicação do hospedeiro, e uma proteína viral multifuncional, a E2, cuja expressão está associada com a regulação da expressão de E6 e E7 (25). A transformação maligna dos queratinócitos envolve a integração do genoma do HPV no genoma da célula hospedeira. Quando ocorre essa integração, a proteína E2 é rompida causando a interrupção da síntese de proteínas virais. Consequentemente, os genes que codificam E6 e E7 deixam de ser inibidos pela E2 e passam a ser expressos em maior quantidade, aumentando a concentração de proteínas E6 e E7 no citoplasma e no núcleo. A expressão dessas impede o término da diferenciação dos queratinócitos infectados, mantendo a célula em um estado

proliferativo necessária para a síntese de DNA, contribuindo assim com o processo de imortalização celular. Originalmente, a E2 não possui atividade transformante, porém, é fundamental na imortalização de queratinócitos infectados com HPVs de alto risco (26,27). Finalmente, ocorre o empacotamento do genoma viral e a formação das partículas virais (vírions) através da ação das proteínas L1 e L2 do capsídeo viral e liberadas por meio da descamação natural dos queratinócitos (28).

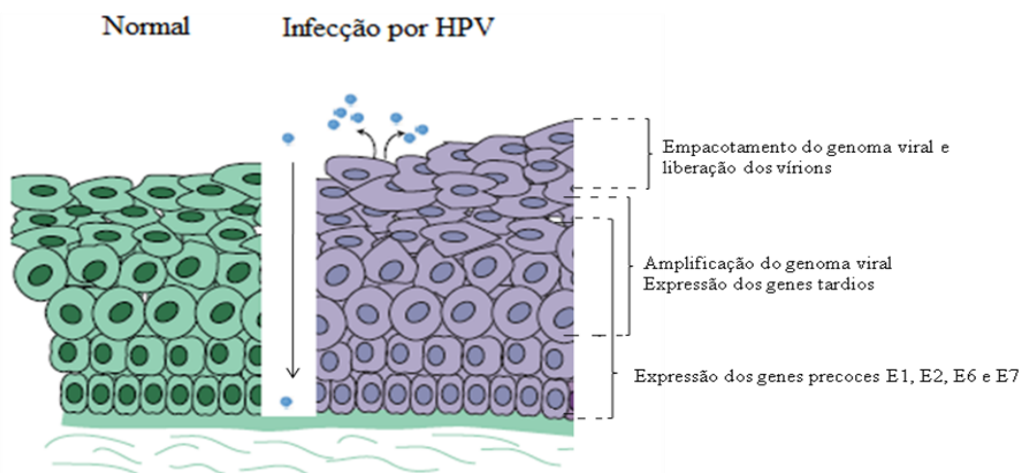


Figura 2: Replicação do HPV no epitélio cervical (Adaptado de McBride, 2017)

Algumas oncoproteínas do HPV de alto risco são capazes de reativar a síntese de DNA em células fora do ciclo celular, retardar a diferenciação e inibir a apoptose, favorecendo assim a replicação do vírus. Estudos indicam que as oncoproteínas E6 e E7 do HPV de alto risco possuem importante papel neste processo, por serem produzidas na fase inicial da infecção (3).

Durante o ciclo celular, a célula sofre algumas interrupções em momentos específicos (G0/G1, G1/S e G2/Mitose) para verificação de possíveis mutações no DNA e seu reparo, quando necessário. A proteína supressora de tumor p53 está intimamente envolvida neste processo, transcrevendo genes de reparo e checando se há algum dano no DNA. Em células que não se encontram em divisão, a p53 é mantida em um estado estacionário. Alguns fatores como lesão no DNA e expressão de oncogenes levam a desregulação da proliferação induzindo a

acumulação de p53 (29), o que pode resultar em uma ativação de vias moleculares que conduzem a parada do ciclo celular, apoptose ou senescência (30).

Alguns oncovírus possuem como estratégia a degradação da p53 (31), como por exemplo, a oncoproteína E6 de HPV de alto risco, que se liga e inibe a p53 através de complexo E6-AP (32), possuindo, assim, efeito anti-apoptótico. Uma vez a p53 inativada por essa oncoproteína, não há mais o reparo de células alteradas/danificadas durante o ciclo celular, e assim, a célula permanece no ciclo, passando os danos às células-filhas colaborando com a transformação maligna e desenvolvimento de câncer (33). Além de inibir a apoptose via p53, a E6, como mencionado anteriormente, pode se ligar à região terminal do receptor de TNF (TNF-R1), inibindo a ligação com TNF- α e a formação do complexo funcional de sinalização para morte celular, resultando, então, em um bloqueio de sinais apoptóticos em queratinócitos infectados, facilitando a replicação viral e formação de lesões associadas a oncogenicidade do HPV (34). A oncoproteína E7 tem como primeiro alvo a proteína supressora de tumor, chamada retinoblastoma (pRb), que possui um importante papel no ciclo celular, pois se une ao fator de transcrição E2F, impedindo assim a replicação do DNA celular continuamente. A E7 inibe a pRb, e com isso, há a liberação do E2F, ocasionando então a replicação celular. De fato, tanto a p53 como a pRb são proteínas supressoras de tumor, e sua desestabilização através de degradação ou inativação, levam a uma instabilidade genética favorecendo o aumento exacerbado do número de células e inibição da apoptose (19).

2.1.2. Evasão Imune

As lesões cervicais podem, em sua maioria, regredir espontaneamente. Para que ocorra o desenvolvimento do câncer cervical, é necessário, porém não suficiente, que haja uma infecção persistente por um tipo de HPV de alto risco/oncogênico. Contudo, existem alguns

fatores que podem contribuir para o processo de transformação maligna dessas lesões, como: fatores virais (tipos específicos, coinfeção com outros tipos de HPV, carga viral e integração viral), comportamentais (uso de tabaco/contraceptivos orais, número de parceiros e início precoce da vida sexual e outros) e fatores do hospedeiro (hormônios endógenos, fatores genéticos e relacionados à resposta imune).

Essa relação das infecções por HPV com a oncogênese é, de acordo com a literatura, uma consequência indireta da manutenção de células infectadas em um estado proliferativo. A integração do genoma viral ao DNA do hospedeiro aumenta a instabilidade genômica e a aquisição de mudanças genéticas e epigenéticas. O tempo dessa integração viral está associado ao desenvolvimento de neoplasias de alto grau com a participação das oncoproteínas E6 e E7 (19). Contudo, além dos fatores virais envolvidos na carcinogênese, há descrição de que fatores do hospedeiro, como polimorfismos em alguns genes, como *Bax*, *Bcl2*, *p53*, *TNF- α* e *TNFR1* e *TNFR2*, podem estar envolvidos no desenvolvimento de câncer cervical, assim como falhas da resposta imune. No entanto, em trabalho prévio do nosso grupo, demonstramos que tanto os polimorfismos de *TNFR1+36A/G* (*rs767455*) quanto o de *-383A/C* (*rs223464*) não estão relacionados com o aparecimento de lesões de colo uterino. No entanto, observamos que o genótipo AA do *TNFR1+36A/G* está relacionado à proteção para o surgimento de lesões cervicais de baixo grau (artigo em anexo).

É descrito que o HPV possui estratégias que o permite escapar de vigilância do sistema imune do hospedeiro. Uma delas é o fato da replicação e produção de novas partículas virais ocorrerem em células já destinadas à descamação, conseqüentemente não ocorrendo a formação de um ambiente pró-inflamatório e sem sinais de perigos que alertem o sistema imune. Oncoproteínas de tipos de HPV de alto risco podem estar associadas a esses mecanismos de evasão. Foi descrito na literatura que as oncoproteínas E6 e E7 podem inibir o efeito imunoregulatório do IFN- γ reduzindo a expressão desta citocina e interferindo nas suas vias de sinalização. A E6 interage com o fator regulatório de interferon-3 (IRF-3) e inibe sua habilidade de ativação transcricional e, portanto, bloqueia a expressão de IFN- β , enquanto que a

E7 inibe IRF-1 e a formação do ISGF-3 (35,36). Além disso, foi também descrito que a E5 interfere com a apresentação de antígeno mediada por MHC de classe I através da desregulação da acidificação endossômica e desregulação do tráfico dessa molécula, prevenindo o reconhecimento imune (37).

Algumas evidências sugerem que essas oncoproteínas também inibem a expressão de moléculas de sinalização capazes de reconhecer o HPV. Os PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) são padrões moleculares de reconhecimento de componentes bacterianos e virais e iniciam uma resposta inflamatória a qual dirigem a mecanismos efetores adaptativos ou inatos para eliminar a infecção. Essas moléculas incluem os receptores tipo Toll (TLR – Toll-Like Receptors) (24). Foi visto que a transcrição do gene TLR-9 em células epiteliais primárias *in vitro* possuem sua regulação diminuída pela E6 e E7 do HPV16 (38).

A maioria das infecções por HPV e grande proporção das lesões neoplásicas causadas por este vírus são eliminadas por uma resposta imune efetiva em um curto período de tempo. Entretanto, além dos mecanismos de evasão do sistema imune exercido pelo HPV, falhas na eliminação de células infectadas podem levar a persistência da infecção, o que tem sido ligado a um processo de inflamação crônica e, portanto, aumentando o risco de desenvolvimento de neoplasias e câncer cervical.

2.1.3. Epidemiologia do HPV e Câncer Cervical

O HPV é encontrado facilmente em verrugas e displasias anogenitais, sendo na maioria dos casos sob a forma subclínica. São categorizados como “baixo risco” e “alto risco” de acordo com seu potencial de causar lesões benignas, pré-cancerosas ou cancerosas (39). Considerando as diferenças regionais, a prevalência global de infecção pelo HPV é estimada em 11,7%, onde a maior prevalência é na África e na Oceania. O HPV 16 ainda é o tipo oncogênico mais

freqüente, sendo detectado em 3,2% das mulheres com citologia normal, seguido de 1,4% para o HPV18, 0,9% para o HPV 52, 0,8% para o HPV31 e 0,7% para o HPV 58, também considerando as possíveis diferenças regionais. Existe uma alta prevalência dessa infecção em mulheres jovens com um pico de prevalência em mulheres com menos de 25 anos, seguida de um declínio em mulheres mais velhas. Este declínio é observado em populações da Europa e Américas, porém, o mesmo não ocorre na África e na Ásia. Contudo, um segundo pico de detecção do HPV foi observado em mulheres mais velhas em algumas regiões da África Ocidental, América Central e Sul (4,6). De acordo com o Ministério da Saúde, no Brasil, há 137 mil novos casos por ano de infecção por HPV (disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=816&sid=32>)

Em infecções por HPV de alto risco, principalmente causado pelo HPV16, a resolução da infecção ocorre em uma faixa de 8 a 16 meses. Em contraste, em infecções por HPV de baixo risco, a faixa de tempo é de 4 a 8 meses (40). Sendo assim pode-se afirmar que a maioria das infecções se cura espontaneamente, persistindo apenas em um pequeno número de indivíduos infectados e podendo levar ao desenvolvimento de neoplasias.

Em um estudo realizado por Ribeiro e colaboradores (2011) (41) em Goiânia, foi observado uma prevalência de 86% de infecção por HPV em esfregaços cervicais anormais. De 76 lesões de NIC2/3, o HPV16 foi observado em 40 casos (52%), sendo ainda o mais prevalente em câncer invasivo (88,8%). Infecções únicas e de múltiplos tipos envolvendo o HPV16 foram associadas com o diagnóstico de NIC2. Outro estudo, realizado por Roteli-Martins e colaboradores (2011) (42), buscou avaliar a prevalência de HPV em 3204 mulheres saudáveis no Brasil, Canadá e Estados Unidos. Pelo menos um tipo de HPV foi detectado em 26,6% das mulheres. A prevalência de tipos oncogênicos foi de 21,7% (25% no Brasil, 16,9% no Canadá e 19,1% nos Estados Unidos). A prevalência de infecções pelos HPV16 e 18 foi de 24,8%. Esses dados corroboram com os achados de Queiroz e colaboradores (2005) (43), que avaliaram a prevalência da presença do HPV em pacientes com lesões pré-malignas e malignas na Bahia onde foi observado que o tipo HPV16 era o mais freqüente (30%), seguido dos tipos HPV52,

HPV58, HPV53, HPV33, HPV51 e HPV54. Recentemente, o Ministério da Saúde em conjunto com um hospital de Porto Alegre, RS, divulgou dados preliminares do Projeto POP Brasil - Estudo epidemiológico sobre a prevalência nacional de infecção pelo HPV. Eles incluíram no estudo 27 cidades brasileiras, onde 2.669 participantes homens e mulheres foram analisados para tipagem do HPV. Foi observada uma prevalência estimada de HPV de 54,6%, sendo 38,4% de HPV de alto risco. A população foi composta por uma maioria feminina, brancos e pardos e a média de idade foi de 20,6 anos. Dentre todas as cidades incluídas, a maior e menor prevalência de HPV foi em Salvador (BA) com 71,9% e Recife (PE) com 41,2%, respectivamente. O Rio de Janeiro apresentou uma prevalência de 54,5% (44).

O câncer cervical é a quarta causa de câncer entre mulheres no mundo, com uma estimativa de 528 mil novos casos e 266 mil mortes em 2012 (4). Cerca de 84% dos casos diagnosticados ocorrem países menos desenvolvidos, onde o câncer cervical é o segundo mais prevalente, ficando atrás apenas do câncer de mama. Nos países mais desenvolvidos compreende menos de 1% de todos os cânceres em mulheres. A maioria dos casos de câncer cervical e mortes (285 mil e 144 mil, respectivamente) ocorrem na Ásia, seguido da África (99 mil casos e 60 mil mortes) e as Américas (83 mil casos e 36 mil mortes) (4,45).

No Brasil, estima-se 16.370 novos casos de câncer cervical com um risco de 15,43 casos a cada 100.000 mulheres/ano no biênio 2018-2019. Este tipo de câncer é o primeiro mais incidente no Norte, ocupando a segunda posição nas regiões Nordeste e Centro-Oeste, e quarta posição no Sudeste e Sul (46). Em países em desenvolvimento, como no Brasil, esforços tem sido direcionados na implementação de estratégias para o rastreio do do câncer cervical e suas lesões precursoras, levando a uma redução da incidência e mortalidade por este câncer. Contudo, em países mais desenvolvidos como os da Europa Ocidental, as taxas vêm aumentando possivelmente devido às mudanças no comportamento sexual, aumentando o risco de exposição ao vírus e infecção (47).

A infecção pelo HPV é silenciosa, não causando sintomas na maioria dos casos, e por isso só é detectada através de exames preventivos, como o de Papanicolaou. Este exame busca

alterações celulares condizentes com a presença de lesões precursoras, que se não acompanhadas e tratadas, podem evoluir para o câncer. O câncer cervical caiu da segunda posição, em 1975, para sétima posição, em 2012, no ranking de neoplasias mais incidentes (46), demonstrando a importância do desenvolvimento e implantação de estratégias de rastreamento e programas de prevenção.

2.2. FATOR DE NECROSE TUMORAL – ALFA (TNF- α)

2.2.1. Aspectos Gerais

TNF- α é conhecida como uma importante citocina inflamatória descrita, primeiramente, como uma molécula solúvel capaz de induzir a necrose hemorrágica em tecidos tumorais em modelos animais experimentais (48). É sintetizada como uma proteína trimérica transmembrana tipo II de 26kDa (mTNF- α), a qual é clivada pela TACE (enzima conversora de TNF), gerando a forma solúvel sTNF- α , de 17kDa. As duas formas, transmembrana e solúvel, exercem seu papel biológico através da ligação com os receptores TNFRI e TNFRII (49). TNF- α é uma citocina de ação pleiotrópica, produzida primariamente por células da linhagem monocítica, como macrófagos, células de Langerhans, micróglia, macrófagos alveolares, células de Kupffer, e astroglia, contudo, células linfóides, endoteliais, fibroblastos e tecido neuronal também expressam esta citocina (50). Possui importante papel na promoção da resposta imune agindo principalmente na resposta inflamatória estando envolvido no recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais da infecção, além de estimular a secreção de quimiocinas pelas células endoteliais e também por macrófagos (51). Entretanto, o TNF- α quando produzido em altas quantidades pode prejudicar o controle das infecções, uma vez que entra na corrente sanguínea e

age em locais distantes. Nessas condições, o TNF- α pode agir na indução da febre, aumento da síntese de proteínas séricas nos hepatócitos e levar ao choque séptico (52).

A produção de TNF- α , induzida por estímulos bacterianos, tumorais, imunes, irradiação ou hipóxia, é regulada a nível pós transcricional, levando à produção de pró-TNF intracelular onde é inserida na membrana como mTNF- α (53). Contudo, sua ação é muito bem controlada pelos fatores de transcrição NF κ B e NF-AT. Quando ocorre um destes estímulos, o RNA mensageiro (RNAm) de TNF- α aparece alguns minutos depois, porém, a expressão da proteína é controlada após a transcrição (54).

Linfócitos T expressando mTNF- α como ligante, atuam na defesa contra patógenos intracelulares, ativação de células endoteliais e células B e produção de citocinas por monócitos. Além disso, quando expressos por células dendríticas (CD), aumentam a proliferação e citotoxicidade de células Natural Killer (NK) (55,56). Em contrapartida, o mTNF- α atuando como receptor, é capaz de transmitir sinais reversos, ou seja, de fora para dentro da célula que está carreando o mTNF- α , como nas células T, monócitos, macrófagos e células NK, colaborando para a regulação da resposta imune (55). Por exemplo, células tumorais carreando o TNF- α na superfície podem ser estimuladas pelo receptor de TNF- α tipo II (TNFR2), induzindo um sinal reverso ativando NF κ B e assim, podendo levar a sobrevivência da célula tumoral e resistência a apoptose (57). Uma vez que o TNF- α se liga a um de seus receptores (TNFR1 ou TNFR2), ocorre uma cascata de sinalização intracelular que, dependendo do estímulo, pode desencadear tanto a morte celular por apoptose, como a ativação celular.

2.2.2. TNF- α no desenvolvimento do câncer

O desenvolvimento do câncer está intimamente ligado a processos inflamatórios crônicos, onde níveis elevados de mediadores inflamatórios e aumento do número de células

imunes estão associados a um mau prognóstico em pacientes com câncer (58). Essa ligação entre inflamação e câncer foi comprovada pela observação da proliferação celular descontrolada e presença de células inflamatórias no local da inflamação. Além disso, uma inflamação crônica pode ser capaz de alterar a expressão de oncogenes e genes supressores tumorais (59,60). A resposta inflamatória pode ser tumorigênica ou anti-tumorigênica, dependendo de como ocorre a resposta imune inata ou adaptativa. Uma resposta imune adquirida quando bem regulada é anti-tumorigênica, contudo, uma resposta inapropriada pode levar à inflamação crônica e progressão para a carcinogênese (59).

Um dos principais mediadores do processo inflamatório é o TNF- α . Contudo, esta citocina desempenha um duplo papel no que diz respeito ao desenvolvimento do câncer, podendo tanto promover o tumor por estimular o crescimento, proliferação, invasão e metástase, como possuir efeitos antitumorais, promovendo a destruição do estroma tumoral induzida por linfócitos T citotóxicos ou por macrófagos e células dendríticas intratumorais, levando à rejeição tumoral (61,62).

O envolvimento do TNF- α no câncer pode ser demonstrado pela maior concentração desta citocina no soro de pacientes com diferentes tipos de câncer (63,64). Em leucemia linfocítica, adenocarcinoma de Barrett, câncer de próstata, mama e câncer cervical, por exemplo, foi observado níveis elevados de TNF- α em lesões pré-cancerosas e tumorais associadas a progressão de malignidade dessas doenças (65,66).

Estudos *in vitro* demonstraram que o TNF- α pode promover a proliferação de linhagens celulares malignas através da regulação de Ras e c-Myc, reguladores do ciclo celular, e diminuição dos níveis de inibidores, como Cdk, o qual é observado na doença de Barrett/adenocarcinoma esofágico (67). Além disso, esta citocina pode ativar moléculas como NF κ B, PI3K-Akt e MAPKs, agindo como um fator de crescimento autócrino, levando à sobrevivência celular (68). Outras vias pelas quais o TNF- α favorece a progressão tumoral é induzindo células malignas a aumentarem a expressão de metaloproteinases de matriz (MMP's) (69); e de uma maneira depende da dosagem, pode alterar a vasculatura do tumor. Em doses

altas pode induzir o colapso vascular do tumor, contudo, em doses mais baixas, pode promover a angiogênese por induzir a expressão de fatores como VEGF, VEGFR2, b-FGF, IL-8, PAF, EfrinaA, NO, E-selectina e ICAM-I (70).

2.2.3. TNF- α e a infecção pelo HPV

A resposta imune do hospedeiro orchestra a emergência e as características das lesões clínicas (71). A resposta imune inata a infecções é caracterizada por um infiltrado de células inflamatórias e secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no local da infecção (24). Porém, em infecções persistentes causadas pelo HPV, o epitélio cervical é caracterizado por infiltrados modestos de macrófagos e linfócitos, embora um aumento seja evidenciado durante a progressão dessa lesão para um câncer invasivo (72). Infecções por HPV implicam na produção de diversas citocinas pró-inflamatórias por queratinócitos e demais componentes da resposta imune inata e adaptativa, como macrófagos, células NK e linfócitos (73).

O TNF- α é uma citocina de perfil Th1 sendo a maior mediadora da inflamação da pele e mucosa, um dos primeiros mediadores imunes a combater infecções virais, e foi sugerido que esta citocina está envolvida nos mecanismos efetores mediados por células imunes para combater a infecção pelo HPV (74). A maioria das lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL, do inglês *Low Squamous Intraepithelial Lesion*) causadas pelo HPV apresentam regressão espontânea, e essa regressão é mediada pelo sistema imune do indivíduo (75). Estudos demonstraram que pacientes com lesões de alto grau (HSIL, do inglês *High Squamous Intraepithelial Lesion*) ou câncer possuem uma resposta Th1 reduzida e um aumento de células com perfil Th2 e este perfil está associado com progressão da lesão. Um estudo que visou analisar o perfil de citocinas no colo uterino de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical (NIC), demonstrou que a proporção de RNAm de TNF- α , assim como IL-12, foi observado com

baixa frequência em pacientes com vários graus de lesão comparado com controles (pacientes sem lesão), sugerindo novamente a diminuição do perfil Th1 em lesões de alto grau (76,77). Outro estudo observou uma diminuição dos níveis de TNF- α no soro de mulheres com câncer invasivo em relação a mulheres com NIC, demonstrando uma associação entre a diminuição da resposta inflamatória e a progressão da lesão para um câncer (78). Já em nossos estudos prévios (79), identificamos a presença de células produtoras de TNF- α no colo uterino durante a infecção pelo HPV, distribuídas preferencialmente no estroma, com morfologia característica de macrófagos.

De uma maneira geral, células mononucleares expressando TNF- α foram associadas à regressão espontânea de papilomavírus (80). Porém, resultados controversos podem ser observados em diversos estudos, como visto por Boccardo e colaboradores (2010) (73), o qual mostrou que linhagens celulares de câncer cervical HPV positivas foram resistentes ao efeito antiproliferativo do TNF- α . Em contrapartida, alguns estudos observaram que queratinócitos imortalizados por HPV 16 foram sensíveis aos efeitos do TNF- α , enquanto que, por HPV 18, se tornaram resistentes. Essa diferença pode ser explicada pelo fato do subtipo 18 estar relacionado à grande atividade de transformação *in vitro*, e pelo fato de que sua região promotora é de 10 a 50 vezes mais ativa do que a região promotora do HPV 16 (81). Além disso, a resposta ao tratamento com TNF- α , pode estar relacionada à diferença de perfis de expressão do gene e níveis de ativação de NF- κ B exibidas por essas linhagens sob efeito do TNF- α (82).

Trabalhos relatam o envolvimento direto entre as oncoproteínas E6 e E7 do HPV e o TNF- α . A oncoproteína E6 está relacionada à resistência da apoptose mediada por TNF- α , sendo capaz de inibir a apoptose através da ligação ao TNFR1, ao domínio de morte associado ao Fas (FADD) e a pro-caspase 8. A E6 ao se ligar ao FADD e a procaspase 8 medeia a degradação de ambos, tornando essas proteínas incapazes de transmitir sinais apoptóticos (83). O mesmo ocorre quando a mesma se liga a porção citoplasmática do TNFR1, impedindo que o domínio intracelular desse receptor interaja com o TRADD, bloqueando a sinalização para a morte celular, inibindo, assim, a ativação da cascata de caspase (84).

Uma das defesas do organismo em uma infecção viral é a parada do ciclo celular. O HPV, contudo, só consegue se reproduzir nas células em que a síntese de DNA esteja ativa, e para isso, ela utiliza mecanismos que conseguem superar essa defesa, através de suas oncoproteínas, que anulam as funções da pRb e p53, proteínas que regulam o ciclo celular (85). A presença da E7 tem sido associada à resistência ao efeito anti-proliferativo do TNF- α . De acordo com um estudo realizado por Basile e colaboradores (2001) (85), a E7 atenua a parada do ciclo e a diferenciação celular em queratinócitos humanos, através da ligação e estabilização da proteína p21^{Cip1/Waf1}, anulando sua função durante a diferenciação induzida por Ca²⁺. Foi descrito também que células expressando E7 do HPV16 podem conter baixos níveis de TNFR1, consequentemente resultando em uma diminuição da resposta celular ao TNF- α , e que a E7 é também capaz de inibir a apoptose mediada por TNF- α em fibroblastos humanos normais. Estes autores observaram que células expressando E7 tratadas com doses de TNF- α (1-30ng/ml) junto com cicloheximida apresentaram mais que 50% de diminuição da tendência de sofrer apoptose em resposta ao TNF- α , quando comparadas com células infectadas com um controle retrovírus. Em contrapartida, eles observaram que o TNFR1 permaneceu funcional nessas células expressando E7 e não foi observada interação direta desta oncoproteína com o complexo TRADD/FADD e nem com a caspase-8, sugerindo que o efeito desta oncoproteína na apoptose mediada por TNF- α provavelmente ocorre de maneira indireta (86). Na mesma linha, Boccardo e colaboradores (2010) (27) demonstraram que queratinócitos transfectados com os genes E6/E7 do HPV 16 e E6/E7 e E7 do HPV 18 apresentam sua síntese de DNA parcialmente inibida pelo tratamento com TNF- α , demonstrando mais uma vez que essas oncoproteínas conferem resistência dos queratinócitos a esta citocina.

2.3. O MICROAMBIENTE TUMORAL

O processo de desenvolvimento do tumor consiste de três estágios: a iniciação, a progressão e a metástase. Para que isso ocorra é necessário o envolvimento de vários componentes, celulares e não celulares, que compõe o microambiente tumoral (MAT). Se por um lado, em condições estáveis e equilibradas, o MAT protege contra o desenvolvimento tumoral, quando ocorre uma desestabilização, o mesmo contribui para a iniciação do tumor.

O MAT é composto por um infiltrado celular com vários tipos de leucócitos (ímunos e inflamatórios), células endoteliais sanguíneas e linfáticas, fibroblastos associados ao câncer, miofibroblastos e células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, que contribuem com o desequilíbrio da homeostase tecidual, alterando a matriz extracelular (MEC), que consiste do componente não celular do MAT (87,88).

Mesmo diante de um grande infiltrado celular imune, os sinais oriundos do tumor prejudicam o papel antitumoral destas células, e essas mesmas podem ser capazes de promover o crescimento tumoral. Além disso, o tumor pode desenvolver a habilidade de escapar do sistema imune do hospedeiro através da ativação de mecanismos moleculares que desencadeiam a inibição das células imunes ou inibição da apoptose das células antitumorais, sendo a ativação da sinalização de NF- κ B, um desses mecanismos, favorecendo a sobrevivência tumoral (89).

O infiltrado tumoral, composto por uma variedade de células do hospedeiro, quando em conjunto com as células tumorais, altera o compartimento estromal modificando a MEC, e criando um ambiente propício para a invasão de células alteradas (90,91). Estas mudanças na MEC podem levar a alterações em sua arquitetura, no que diz respeito à disposição de colágenos e outros componentes não celulares da MEC, que também são fatores importantes para o desenvolvimento tumoral tanto no estágio inicial, como em locais metastáticos (92).

Com isso, podemos destacar a importância do conhecimento profundo do microambiente tumoral e todos os seus componentes, não apenas celulares, para que se possa melhorar as estratégias de terapia contra o câncer.

2.3.1. A Matriz Extracelular (MEC)

Sendo um dos principais componentes do microambiente tumoral, a MEC tem como função garantir o equilíbrio estrutural do tecido, atuando de maneira ordenada e podendo regular algumas funções celulares, além de possuir diferentes funções físicas, bioquímicas e biomecânicas. Contudo, quando há uma desregulação e desorganização da MEC, as células começam a se comportar de maneira anormal, levando a uma falha na homeostase tecidual e função do órgão (91).

A MEC é composta por vários componentes bioquímicos com diferentes funções, como: colágeno e elastina, que conferem o arcabouço estrutural e elasticidade do tecido; fibronectina e laminina, relacionadas com a adesão da matriz às células; e polissacarídeos e proteoglicanos, os quais conferem resistência tecidual e são responsáveis pela troca de nutrientes (93). Estes componentes formam tanto a membrana basal como a matriz intersticial. A membrana basal é uma MEC especializada, mais compacta e menos porosa, composta por colágeno tipo IV, laminina, fibronectina e proteínas que conectam o colágeno a outras proteínas. É produzida em conjunto por células epiteliais, endoteliais e células do estroma e separa o epitélio ou endotélio do estroma. A matriz intersticial é rica em colágenos fibrilares, proteoglicanos e glicoproteínas, garantindo aos tecidos uma maior resistência à tração, e composta preferencialmente por células estromais (94).

Em condições patológicas há o enrijecimento da matriz, consequentemente afetando a biomecânica do tecido, como a elasticidade, e desta forma, as células passam a responder

exercendo tipos de forças diferentes (95). As propriedades físicas da MEC, como rigidez, porosidade e insolubilidade desempenham papel na migração celular, e também sofrem alterações sob estas condições. As fibras de colágeno reticulares, que são rígidas, potencializam a migração celular, enquanto que fibras reticulares da matriz impedem a migração, a menos que metaloproteinases de matriz (MMPs) sejam, ao mesmo tempo, ativadas (94).

O desenvolvimento e remodelamento da MEC é rigidamente regulado através do controle da expressão e/ou atividades de algumas enzimas, como por exemplo, as MMPs. O comprometimento da dinâmica da MEC, durante o desenvolvimento do câncer pode afetar a barreira física do tecido e favorecer a transição epitélio-mesenquimal, e conseqüentemente levar a invasão de células cancerígenas no tecido através do aumento da expressão de MMPs (96).

2.4. METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMPs)

Os processos de desenvolvimento, morfogênese, reparo e remodelamento do tecido estão intimamente relacionados com a degradação do colágeno, porém, sempre muito bem regulado em condições patológicas (97). Contudo, a degradação da MEC, abrangendo todos os seus componentes, é dependente da ação de enzimas proteolíticas (98), como as MMPs, também chamadas de matrixinas. Essas enzimas, além de degradar colágeno, são também capazes de degradar e processar outros componentes da matriz, como a membrana basal (99).

As MMPs pertencem a uma família de enzimas dependentes de zinco envolvidas, principalmente, na degradação de componentes da matriz extracelular (MEC) (100). São classificadas de acordo com as características determinadas pela sua estrutura e especificidade do substrato, como: colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas e metaloproteinases ligadas à membrana (MT-MMP) (101). Atualmente são conhecidas 24 MMPs, onde 23 são humanas (Figura 3).

Proteína	MMP	Substrato
<i>Colagenase 1</i>	MMP-1	Colágenos I, II e III
<i>Colagenase 2</i>	MMP-8	
<i>Colagenase 3</i>	MMP-13	
<i>Gelatinase A</i>	MMP-2	Colágeno desnaturado (gelatina) e colágeno IV
<i>Gelatinase B</i>	MMP-9	
<i>Estromelisinina 1</i>	MMP-3	Fibronectina e proteoglicanos
<i>Estromelisinina 2</i>	MMP-10	
<i>Matrilisina 1</i>	MMP-7	Fibronectina e colágeno IV
<i>Matrilisina 2</i>	MMP-26	
<i>MT1-MMP transmembrana</i>	MMP-14	Colágeno I, II, III, gelatina e fibronectina
<i>MT2-MMP transmembrana</i>	MMP-15	Fibronectina e laminina
<i>MT3-MMP transmembrana</i>	MMP-16	Colágeno III e fibronectina
<i>MT4-MMP ancorada ao GPI</i>	MMP-17	Gelatina e fibronectina
<i>MT5-MMP transmembrana</i>	MMP-24	Proteoglicanos
<i>MT6-MMP ancorada ao GPI</i>	MMP-25	Gelatina

Figura 3. Classificação das principais MMPs (fonte: Nagase et al, 2006)

As MMPs possuem funções específicas na morfogênese do desenvolvimento, como: ramificação ductal da glândula mamária, ossificação, remodelamento dos vasos sanguíneos, além de agirem na manutenção normal do tecido, cicatrização, menstruação, processos reprodutivos como implantação do trofoblasto e embriogênese, e defesa imune inata (102–104). Uma vez que estas enzimas sofrem uma desregulação ou uma alteração na sua expressão, elas podem desencadear processos patológicos como doenças inflamatórias e câncer (105).

As MMPs, de um modo geral, podem ser expressas por diversos tipos celulares, dentre eles os fibroblastos, neutrófilos, macrófagos, células endoteliais, queratinócitos e linfócitos (106) e possuem outras funções além da degradação da MEC, como: processamento e modulação de fatores de crescimento, e mediadores da inflamação como citocinas, quimiocinas, e seus receptores, onde estabelecem os gradientes de quimiocinas necessárias para a quimiotaxia de células inflamatórias; facilitam a migração de células epiteliais através da proteólise de moléculas de adesão como a E-caderina; e influenciam na vasculatura através da migração, proliferação e apoptose de células endoteliais (107–109).

Os membros da família de MMP são homólogos em sua estrutura, contendo quatro domínios funcionais distintos: o peptídeo sinal, N-terminal, responsável pela secreção das

MMPs; o domínio catalítico, responsável pela atividade proteolítica; o propetideo, que participa da regulação da atividade da MMP através da interação com os íons de Zn^{2+} (110,111), o qual retém a enzima na sua forma latente, ou seja, inativa; e o domínio semelhante a hemopexina, C-terminal, responsável pelo reconhecimento do substrato (com exceção da MMP-23). As MT-MMPs podem estar ligadas à membrana de duas formas: através do domínio transmembrana, seguida por uma cauda citoplasmática curta, ou ancoradas ao GPI (112).

2.4.1. Regulação e atividade das MMPs

Em tecidos saudáveis, sob condições fisiológicas normais, a atividade proteolítica das MMPs é baixa, sendo sua expressão regulada transcricionalmente por citocinas inflamatórias, como TNF- α , fatores de crescimento, como EGF (fator de crescimento epidérmico) e TGF- β , hormônios, interação célula-célula e célula-matriz (113–115). Grande parte dos membros da família de MMPs possui um elemento *cis* em sua região promotora, o que permite o forte controle de sua expressão pelas células, permitindo assim que elas sejam co-expressas e co-reprimidas em respostas aos estímulos acima citados (116). Porém, algumas proteases também podem ser reguladas a níveis pós-transcricionais. Os transcritos das MMPs possuem sequências específicas em suas regiões 5'-UTR e 3'-UTR, que são alvos de proteínas que podem se ligar e estabilizar e desestabilizar o RNAm (112,117). Um exemplo dessa modulação pós-transcricional é através dos microRNAs, que são pequenas sequências de RNA não codificantes, que regulam a expressão gênica, reprimindo a tradução ou por degradação dos seus alvos de RNAm. Como por exemplo o miR-21 que leva a repressão do supressor de tumor PTEN, levando a forte regulação de MMP-2, em um modelo de infarto do miocárdio em camundongos (118). Este mesmo microRNA também é capaz de regular negativamente o inibidor TIMP-3, e

consequentemente levar a ativação de MMPs, colaborando com a invasão de células cancerígenas (119).

Estudos experimentais já demonstraram que a expressão de MMP é transitória após a exposição a um estímulo externo, levando a acreditar que os genes da maioria dessas proteases são induzíveis. Contudo, em casos de câncer, as células tumorais passam a expressá-las constitutivamente em altos níveis, indicando que outros tipos de mecanismos podem estar colaborando para a regulação de MMPs, como no caso da metilação, uma vez que, a região promotora de diversos genes de MMP possuem ilhas CpG que podem ser metiladas, levando ao silenciamento do gene (117,120).

As MMPs são secretadas ainda na sua forma inativa como pro-MMP (zimógeno) e são ativadas no espaço extracelular, com exceção das MT-MMPs, MMP-11, -23 e -28, que são ativadas no meio intracelular por uma pro-proteína convertase, como a furina. Uma vez madura, a atividade das MMPs é regulada por inibidores gerais de protease como α 2-macroglobulina no plasma e fluidos sanguíneos e os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) no tecido (121); além de reativos de oxigênio, ácido hipocloroso originados dos leucócitos durante o processo inflamatório, e as próprias MMPs e outras proteases (112).

Fatores de crescimento e citocinas possuem importante papel na indução de algumas atividades das MMPs. O PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) leva ao aumento da expressão de MMP-1 e quando em ação conjunta com TGF- β , aumenta a expressão de MMP-3 e TIMP-1 (122). A MMP-1 cliva colágeno tipo I e III, favorecendo a cicatrização, migração e reepitelização. O EGF induz a expressão de MMP-1 em fibroblastos da pele; quando se une ao seu receptor EGR-1, é capaz de reprimir a ativação transcricional de *MMP-9* em células estromais (123). O VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e o FGF-2 (fator de crescimento de fibroblastos) atuam como fatores angiogênicos induzindo a expressão de MMP e facilitando a metástase. No microambiente tumoral, a citocina pró-inflamatória TNF- α induz o aumento da expressão das MMP-2, -3, -7 e -9, facilitando a invasão de células malignas (124,125).

Os TIMPs são os inibidores endógenos das MMPs, pertencentes a uma família de quatro membros homólogos, TIMP-1, -2, -3 e -4, onde todos são capazes de inibir todas as MMPs, porém, com variações em sua eficácia (126). Por exemplo, TIMP-1 é um pobre inibidor de MT1-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP e MMP-19, enquanto que TIMP-2 é o único que além de inibir, é capaz de ativar pro-MMP-2, através da interação com MT1-MMP (121). A primeira evidência de que estes inibidores possuem importante papel na degradação da MEC, surgiu da observação que TIMPs são capazes de inibir várias MMPs *in vitro* e que o aumento da expressão de TIMP foi associado com o acúmulo de matriz. Essa observação foi capaz de demonstrar também a importância do equilíbrio entre TIMP e MMP na homeostase da matriz (126). Essa inibição ocorre através da ligação do domínio amino-terminal de TIMP, que é inibitório, ao sítio ativo das MMPs (127).

Produzidos por uma variedade de tipos celulares, os TIMPs podem ser expressos de maneira constitutiva, induzida ou tecido-específica, sendo regulados ao nível transcricional por citocinas e fatores de crescimento (127). Inicialmente, foi relatado que os TIMPs 1, 2 e 4 eram considerados inibidores solúveis, enquanto o TIMP-3 foi encontrado na matriz através de ligações de sulfatos proteoglicanos. Contudo, recentemente foi visto que os TIMPs localizam-se em interação com receptores de superfície celular específicos, e que esta interação está associada com atividades independentes da inibição de MMP (126,128), como modulação da proliferação celular, migração e invasão, e atividade anti-angiogênica e anti- e pro-apoptose; além disso são capazes de aumentar os níveis de Ras-GTP, envolvida no controle da multiplicação e diferenciação celular (129). TIMP-1 aumenta a atividade de fatores de sobrevivência e diferenciação, através da ligação com CD63, FAK e ERK; e TIMP-2 se liga à integrina $\alpha_3\beta_1$ (127). TIMP-2 ainda é capaz de inibir a proliferação e migração de células endoteliais humanas, quando estimuladas por FGF-2, sendo sugerido que este efeito é mediado por um mecanismo receptor de superfície celular (130).

A ativação de pro-MMP-2 ocorre através da interação do domínio N-terminal de TIMP-2 com a região catalítica MT1-MMP (MMP-14), formando um complexo MT1-MMP-TIMP2-

proMMP, onde a pro-MMP-2 é clivada e sua forma ativa liberada. Com base nesse processo, foi sugerido que o MT1-MMP deve atuar como um receptor de superfície pelo qual TIMP-2 poderia influenciar no crescimento celular; contudo não há evidências que este mesmo mecanismo possa levar à supressão da proliferação de células endoteliais (124).

O TIMP-3 pode promover a apoptose em linhagens de células tumorais e células musculares lisas, porém, envolvendo a modulação da atividade das MMPs (127). Possuem atividade anti-angiogênica ao atuar como antagonista de VEGFR-2, de uma maneira independente da inibição de MMP (131). Já o TIMP-4, embora mecanismos não tenham sido descritos, é sugerido aumentar ou inibir o crescimento de enxertos tumorais *in vivo* (132).

2.4.2. O papel das MMPs no Câncer

Todo o processo de invasão tumoral é orquestrado por um grande conjunto de células incluindo as próprias células tumorais, as células estromais adjacentes e as células inflamatórias intratumorais, e acredita-se que todas são capazes de expressar uma variedade de MMPs (133). Contudo, as células do estroma não malignas são as principais fontes de produção de MMP, pois são induzidas pelas células tumorais através da secreção de citocinas e fatores de crescimento (134).

Durante um processo carcinogênico, as MMPs são capazes de degradar moléculas de adesão que medeiam a interação célula-célula ou célula-MEC (ex.: caderinas e integrinas), levando a célula tumoral a se separar das células adjacentes e da MEC. Além disso, degradam a membrana basal e a MEC facilitando a locomoção e invasão das células tumorais, permitindo que estas alcancem e penetrem os vasos sanguíneos ou linfáticos, levando à metástase (135). Durante este processo, as MMPs podem modular a biodisponibilidade de fatores de crescimento e função/ativação dos receptores de superfície, liberar precursores de alguns fatores de

crescimento ligados à membrana celular, ativar vias de sinalização de promoção de sobrevivência e degradar mediadores de apoptose ou mediadores da imunidade antitumoral, sustentando assim as células tumorais e promovendo a proliferação celular (135,136).

Na angiogênese, etapa fundamental no desenvolvimento tumoral, as MMPs exercem importante função, uma vez que podem degradar a membrana basal dos vasos sanguíneos e recrutar precursores de células endoteliais da medula óssea para os vasos recém-formados (137). A MMP-9, uma das principais reguladoras deste processo, pode tanto ativar fatores pró-angiogênicos, como VEGF, FGF e TGF- β , e promover a migração de células endoteliais (138–140), como gerar inibidores de angiogênese, tais como endostatina e tumestatina, através da proteólise da MEC e membrana basal dos vasos (136).

Outro mecanismo que contribui para a expansão tumoral é o escape da resposta imune. As MMPs produzidas por células tumorais podem interferir na quimiotaxia de células inflamatórias para os tecidos, por clivagem de algumas quimiocinas (141). Em um contexto de melanoma, foi visto que a MMP-2 é capaz de interferir na função das células dendríticas, modificando a resposta imune adaptativa para um fenótipo Th2, pró-tumorigênico (142). MMP-1, -2 e -9 também são capazes de regular negativamente receptores de interleucina na superfície de células T, diminuindo assim a imunidade e promovendo a tolerância ao câncer (143).

Vários estudos vêm focando na associação de MMPs com o desenvolvimento de vários tipos de câncer. A expressão de MMP-9, por exemplo, foi correlacionada positivamente com a expressão de VEGFR-1 em pacientes com carcinoma hepatocelular (CHC), onde os mesmos exibiram o pior desfecho clínico da doença, sugerindo a MMP-9 como um marcador prognóstico de CHC (144). Em carcinoma celular escamoso oral, Shrestha e colaboradores (2017) (145), observaram uma correlação positiva entre MMP-2 e TIMP-2 com o grau, estágio e capacidade metastática do tumor, sendo a maior expressão de MMP-2 associada com uma reduzida sobrevida em pacientes com câncer. Os autores sugeriram que a expressão desta enzima pode ser uma característica biológica intrínseca de tumores podendo indicar um comportamento tumoral agressivo, independente do estágio, enquanto que TIMP-2 demonstrou

relação com o estágio da doença. Chang e colaboradores (2014) (146) observaram em pacientes com câncer gástrico, um aumento nos níveis séricos de MMP-3, -7 e -11, e de MMP-9, -12 e -21 em amostra de tumores, e associaram com a reduzida sobrevida destes pacientes. Da mesma maneira, um estudo avaliando a imunexpressão de MMP-9, demonstrou uma forte associação entre a presença desta enzima em pacientes com metástase de câncer de mama, que haviam ido a óbito (147).

2.4.3. O papel das MMPs no câncer cervical

As oncoproteínas do HPV de alto risco, E6 e E7, desempenham importante papel na carcinogênese cervical. A oncoproteína E6, além de ser capaz de bloquear sinais apoptóticos, é capaz de reativar a atividade de telomerase, levando à imortalização da célula infectada (148). Da mesma maneira, E7 interrompe o *checkpoint* do ciclo celular e induz a instabilidade gênômica (149). Com base nestes estudos, a associação das oncoproteínas do HPV e as MMPs vem sendo estudada no desenvolvimento de câncer cervical.

Foi observado que estas oncoproteínas podem desestabilizar a interação das MMPs com seus reguladores, além de afetar a migração e invasão celular. Estudos *in vitro* demonstram que linhagens de queratinócitos HPV negativa transfectadas com E6 e E7, principalmente do HPV16, apresentaram maior expressão de pró-MMP-9, MMP-2 e MT1-MMP, enquanto que a co-expressão de E6/E7, levou à diminuição de TIMP-2. Contudo, seu silenciamento levou à diminuição dos níveis destas MMPs (150,151). Da mesma forma, linhagens celulares HPV16 positivas apresentaram alta expressão de MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP, e uma vez silenciadas E6 e E7, houve diminuição tanto dos níveis de proteína como de RNAm destas MMPs (152). Em todos os trabalhos, o silenciamento destas oncoproteínas levou à redução da capacidade migratória destas células.

Um estudo de análise proteômica do secretoma das linhagens de câncer cervical C33A (HPV negativa), HeLa (HPV 18 positiva) e SiHa (HPV 16 positiva) demonstrou que a via de inibição de MMPs foi prevista ser ativada em linhagens de câncer cervical, onde TIMPs foram super regulados nestas linhagens quando comparadas com HCKT1 (normal), e as MMPs -2 e -9 não foram identificadas no secretoma destas linhagens. Através de zimografia, os autores confirmaram o aumento da regulação dos TIMPs, levando à diminuição ou à ausência de atividade catalítica de MMP-2 e -9 no secretoma destas células (153).

No contexto clínico, estudos vêm demonstrando a associação da expressão destas MMPs com o desenvolvimento e estágio do câncer cervical. Alguns grupos destacaram o envolvimento das MMPs -2, -9 e MT1-MMP no desenvolvimento e progressão de tumores de colo uterino baseado no aumento de expressão de RNA mensageiro e proteína em NIC2/3 e câncer invasivo, enquanto que em NIC1 ou normal a presença foi diminuída ou ausente. Além disto, estas MMPs também foram correlacionadas com a angiogênese durante a evolução de uma lesão de alto grau para um câncer, e com a densidade vascular dos tumores (154). O aumento MMPs -1, -9 e MT1-MMP, e diminuição de TIMP-1 e -2, foram associadas com potencial invasivo em células tumorais, onde MMP-1 e -9 apresentaram expressão aumentada em tumores metastáticos; em tecidos normais adjacentes ao tumor, houve uma expressão substancial de MMP-1, MMP-9 e MT1-MMP (155). Guo e colaboradores (2018) (156) observaram uma associação entre o aumento da expressão de MMP-7 e -9 com a metástase de tumores de linfonodos em pacientes com câncer cervical inicial, sugerindo que há uma correlação positiva destas MMPs com o potencial invasivo de tumores cervicais. O mesmo foi observado por Wu e colaboradores (2006) (157) ao relatarem aumento de RNAm de MMP-7, assim como a proteína, em tecidos de câncer cervical e tumores metastáticos de linfonodo. Estes resultados sugerem que estas enzimas podem contribuir com o aumento do potencial invasivo do tumor.

Furtado e colaboradores (2015) (158) analisaram a presença de metilação de *TIMP-2* em lesões cervicais precursoras (LSIL e HSIL), câncer invasivo e amostras cervicais normais, e sua relação com a presença de DNA de HPV. A metilação foi detectada com frequência nos grupos

de lesões e câncer em comparação com as amostras controles normais. Embora não tenham encontrado relação estatisticamente significativa entre a metilação de *TIMP-2* e a presença de DNA-HPV, esta combinação foi mais frequente em pacientes com um desfecho clínico desfavorável. O grupo sugere que a metilação de *TIMP-2* inativa certas regiões do gene, reduzindo a expressão da proteína e prejudicando seu papel na supressão tumoral, podendo inferir que a metilação de *TIMP-2* pode ser um biomarcador prognóstico para a evolução desfavorável de lesões.

2.4.4. EphA2/EfrinaA1 e TNF- α como moduladores de MMPs e envolvimento na carcinogênese

Os receptores tirosina quinase (RTKs, do inglês *Receptors Tyrosine Kinases*) é uma classe de receptores ligados a membrana que agem também como enzimas. Muitos membros desta família são considerados importantes reguladores de processos celulares como proliferação, diferenciação, sobrevivência e migração celular e controle do ciclo celular. Certos membros da RTKs são bastante estudados devido aos seus papéis na carcinogênese, e dentre os receptores expressos em células tumorais, o EphA2, pertencente a família de receptores Eph, é o que vem ganhando mais atenção e foco, devido a sua alta expressão em diversos tipos de tumores (159).

A família Eph é dividida em duas subclasses: EphA (EphA1-A10) e EphB (EphB1-B6). A EphA2 foi identificada em 1990 através do rastreamento de uma biblioteca de cDNA da linhagem celular HeLa e foi inicialmente referida como uma quinase celular epitelial devido a sua expressão ser maior em células epiteliais (160). Estes receptores, por sua vez, possuem ligantes específicos chamados de Efrinas, que também são divididos em EfrinaA (EfrinaA1-A6) e EfrinaB (EfrinaB1-B3). A EfrinaA1, o ligante mais estudado para EphA2 no câncer, foi

identificado como um produto genético induzido por citocinas em células endoteliais de veias umbilicais humanas, e sua expressão demonstrou ser induzida por TNF- α (161,162). De uma forma geral, Ephs e Efrinas são expressas a níveis baixos no tecido adulto normal e em altos níveis durante o desenvolvimento. A ligação do receptor Eph com seu ligante Efrina possui efeitos na regulação do crescimento de axônios, mediação da repulsão célula-célula, restringem a migração celular, além de regular a remodelação da rede vascular durante a embriogênese (163).

Em tecidos normais, a EphA2 é expressa em células epiteliais enquanto que EfrinA1 é expressa em células vizinhas. Quando há a ligação entre receptor e ligante, a EphA2 é autofosforilada em sua porção citoplasmática levando a uma cascata de sinalização que leva à inibição de sinalizações oncogênicas, e até mesmo a diminuição de sua expressão gênica. Uma vez que há perda de EfrinA1, o receptor então é super expresso na forma não fosforilada, estimulando assim vias de sinalização oncogênicas, levando ao aumento da migração, invasão e promoção da tumorigênese. Desta forma, EfrinA1 contribui com um efeito supressor de tumor (164). Contudo, efeitos opostos deste ligante podem ser observados em tratamento de células de carcinoma hepatocelular, o qual levou à proliferação celular, enquanto que sua supressão obteve efeito oposto (165). Outro estudo demonstrou que a redução de EfrinA1 em células de carcinoma de cólon reduziu o crescimento destas células em uma cultura 3D, mas não em 2D (monocamada) (166). Embora estudos já tenham observado a expressão abundante deste ligante em vários tipos de cânceres, os receptores EphA2 podem se tornar insensíveis ao seu ligante durante a progressão tumoral, apontando uma sinalização deste receptor de uma maneira independente de ligante (167).

Este tipo de sinalização foi descrito por alguns autores onde observaram que EphA2 é clivada pela MT1-MMP. Sugiyama e colaboradores (168) demonstraram que, em células invasivas de carcinoma mamário, MT1-MMP foi capaz de clivar o domínio de fibronectina tipo III de EphA2, e juntamente com a ativação de Src, desencadeou a internalização do receptor, bem como aumento de RhoA e quebra da junção celular, aumentando a motilidade celular e

consequentemente, a invasão. Após o silenciamento de MT1-MMP, houve uma redução no acúmulo intracelular de EphA2, invasão celular e sinalização por Src. Esta mesma interação foi observada pelo grupo de Tatsukawa (2016) (169) em carcinoma invasivo de células escamosas de pele, onde a clivagem de EphA2 por MT1-MMP também foi capaz de desencadear outras vias de sinalização oncogênicas, como Ras/Erk 1-2 e PI3k/Akt. Esses dados demonstram a importância da interação entre essas duas proteínas na invasividade e progressão de células cancerígenas.

A associação entre EphA/Efrina e MMP pode ser vista ainda em casos de câncer ovariano, onde EphA2 foi super expresso em 76% dos tumores e associado com estágio tumoral avançado, grau histológico e densidade dos microvasos; além de ser associado com expressão epitelial aumentada de MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP, e expressão estromal aumentada de MMP-9, demonstrando assim a relação deste receptor com reguladores chave de angiogênese e invasão tumoral (170). Em células de adenocarcinoma pancreático, observaram que a super expressão de EphA2 induziu o aumento da expressão de MMP-2 dependente de FAK e aumento da invasividade. Além disso, a ligação da EphA2 com um ligante EfrinaA1-Fc recombinante, foi capaz de induzir a degradação proteossômica de EphA2, diminuindo a invasão e a fosforilação de FAK e expressão de MMP-2, demonstrando o papel fundamental da interação receptor-ligante para a regulação dos níveis de EphA2 e controle da invasão (171).

Ao nosso conhecimento, até o momento não há relatos na literatura que demonstrem uma associação entre EphA/Efrina e MMPs com o câncer cervical. Contudo, poucos trabalhos descreveram a associação da alta expressão de EphA2 com este tipo de câncer. Um estudo que avaliou o papel prognóstico de EphA2 e EfrinaA1 no câncer cervical, demonstrou uma expressão das proteínas EphA2 e EfrinaA1 em 88% e 92% dos carcinomas cervicais escamosos estágios Ia-IVb, respectivamente, por imunohistoquímica. A alta expressão de EphA2 e a expressão moderada/forte de EfrinaA1 foram associadas com a pior sobrevida dos pacientes com carcinoma, mas não com o estágio da doença. Além disso, demonstraram que a expressão do RNAm, tanto do receptor como do ligante, não correspondem totalmente às suas expressões

protéicas, sendo essa discordância sugerida a uma desregulação pós-transcricional nas células tumorais. O mesmo grupo, posteriormente, demonstrou resultados contraditórios em câncer cervical escamoso estágio IB, onde a alta expressão de EfrinaA1 foi associada à pobre sobrevida livre de doença, sob análise univariada, enquanto que em análise multivariada, nem EfrinaA1 e nem EphA2 foram associadas à sobrevida. O grupo sugeriu, portanto, que EphA2 e EfrinaA1 poderiam ser utilizados como fatores de prognóstico independentes em carcinomas cervicais estágio I-IV, mas não quando se avalia apenas carcinomas cervicais precoces (172,173).

O TNF- α possui importante papel no desenvolvimento do câncer, como já descrito anteriormente, contudo, poucos estudos abordam sua associação com MMPs no câncer. Stuelten e colaboradores (2005) (174), observaram em co-cultura 2D de fibroblastos e células epiteliais de mama derivadas da linhagem MCF10A, que TNF- α e TGF- β derivadas de células estromais, colaboram na regulação da indução de MMP-9 em fibroblastos e estroma tumoral por sinalização de MAPK e Smad, respectivamente; e após a utilização de um anticorpo neutralizantes de TNF- α , houve uma redução significativa da indução de MMP-9 por células tumorais. O TNF- α foi capaz, também, de estimular levemente a expressão de MMP-9 em células HeLa, e de uma maneira dependente da dose em DoT-4510, em ambas linhagens de câncer cervical. Já em linhagem de câncer ovariano SK-OV-3, esta citocina obteve um efeito estimulatório leve na secreção de MMP-2, porém, apenas quando administrado em baixas concentrações, alcançando um efeito inibitório a altas concentrações (175). Lee e colaboradores (2008) (176) demonstraram em uma linhagem proveniente de câncer de bexiga (HT1376), que o TNF- α é capaz de induzir a expressão de MMP-9 por ativação de fatores de transcrição como NF κ B, AP-1 e Sp-1, os quais estão envolvidos na regulação de MMP-9 mediada pelas vias de sinalização ERK1/2 e p38 MAPK. Um estudo recente investigou o impacto da expressão de proteínas induzidas por TNF- α na fusão celular. O perfil de expressão gênica de células epiteliais de mama M13SV1-Cre e células tumorais MDA-MB-435-pFDR1 foi avaliado por cDNA microarray, após tratamento com TNF- α , e foi observado um aumento da regulação de MMP-9. Uma vez que a MMP-9 foi bloqueada com inibidor específico, ou teve sua expressão

inibida através do uso de minociclina, houve uma diminuição da frequência de fusão celular, demonstrando assim o envolvimento da MMP-9 na fusão celular mediada por TNF- α nestas células (177).

A alta expressão de EphA2 e suas vias de sinalização dependente ou independente de ligante, EfrinaA1, e sua associação com MMPs, tem chamado atenção no que diz respeito a progressão tumoral e metástase. Da mesma maneira, o TNF- α foi visto colaborar com a indução da expressão de MMP, especificamente MMP-9, em modelos de câncer distintos. Desta forma, os estudos demonstraram que estes, podem ser considerados possíveis marcadores de prognósticos e alvos terapêuticos para diversos tipos de câncer.

Em síntese, o processo inflamatório cervical pelo HPV e posterior desenvolvimento de lesões malignas são induzidos direta ou indiretamente por um complexo sistema, composto pela interação entre oncogenes do HPV e fatores do hospedeiro, secretados pelos queratinócitos, por células imunes e da MEC. Assim, este trabalho visou interligar dados relacionados a fatores inflamatórios no estudo da carcinogênese, levando em consideração a contribuição pela busca de biomarcadores ligados a indução de MMPs e seus moduladores, tais como TIMP-2, TNF- α , EfrinaA1 e EphA2, que medeiam a degradação da MEC e progressão do tumor.

3. JUSTIFICATIVA

A maioria das mulheres infectadas por HPV permanece assintomática, não desenvolvendo o câncer cervical. É fortemente aceito que a infecção por HPV é um fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical, podendo também envolver um grande número de fatores genéticos e epigenéticos, tornando a carcinogênese um processo complexo. Dentre esses fatores, podem ser citados fatores ligados ao meio ambiente, como o início precoce à atividade sexual, múltiplos parceiros, tabagismo e a presença concomitante de outras doenças sexualmente transmissíveis, como o HIV-1. A procura de marcadores de prognósticos na carcinogênese cervical vem sendo realizada em inúmeros alvos, tanto no controle do ciclo celular, como na apoptose (Bax, Bcl-2 e TNFR1), sendo estes também estudados nesse grupo (9,12). Outros fatores como, a invasão do estroma e posterior metástase, através da ação das metaloproteinases de matriz (MMPs) nos tecidos possui um papel importante na progressão do tumor, o qual envolve a degradação e a remodelagem da matriz extracelular (MEC). Contudo, não há na literatura trabalhos que relatem a modulação e indução dessas MMPs, assim como seus inibidores, no contexto do desenvolvimento e progressão de lesões cervicais e câncer. Desta maneira, o melhor conhecimento a respeito de como as MMPs podem ser induzidas, moduladas e expressas, e seus possíveis papéis no processo de carcinogênese podem levar sua identificação como potenciais biomarcadores de prognóstico e até mesmo alvo terapêutico para pacientes com câncer cervical.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Identificar marcadores associados à carcinogênese cervical em relação à expressão e modulação de MMPs e seus moduladores por TNF- α

4.2. Objetivos específicos

- Identificar e associar a expressão fenotípica das MMPs 2, 7 e 9 e de TNF- α nas lesões de colo uterino.
- Identificar e associar a expressão fenotípica de TIMP-2, EfrinaA1 e do receptor EphA2 nas lesões de colo uterino.
- Avaliar expressão gênica das MMPs e moduladores sob estímulo da citocina pró-inflamatória TNF- α *in vitro* em linhagens de queratinócitos cervicais.

5. METODOLOGIA

5.1. Presença de MMPs e seus reguladores em pacientes com lesões precursoras do câncer cervical

5.1.1. Seleção de pacientes

O presente trabalho trata-se de um estudo caso-controle transversal, onde foram incluídas 60 mulheres, no período de agosto de 2015 e julho de 2017, atendidas no Setor de Patologia Cervical do IFF/Fiocruz, e no Ambulatório de Patologia Cervical do Instituto de Ginecologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IG/UFRJ). Todas as mulheres que apresentaram lesões cervicais pré-invasivas (grupo de casos, IFF e IG) e mulheres que realizaram histerectomia por outros motivos que não uma infecção por HPV (grupo controle, IFF), foram convidadas a participar do estudo no momento da consulta ginecológica e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) autorizando a utilização do material biológico. Os critérios de inclusão adotados foram: mulheres entre 18 e 65 anos e soronegativas para HIV; e como critérios de exclusão, estar grávida no momento do estudo ou fazer uso de imunossupressores.

O fragmento removido (biópsia) foi encaminhado para os Departamentos de Anatomia Patológica do IFF/Fiocruz e do IG/UFRJ, responsáveis pelo diagnóstico histopatológico das lesões presentes nas mulheres incluídas. Os blocos de parafina

foram cedidos pelos respectivos serviços de anatomia patológica para realização da imunohistoquímica.

Durante a realização das reações de imunohistoquímica, muitos cortes foram perdidos devido à soltura dos mesmos das lâminas durante os experimentos, levando a diminuição do número de amostras utilizadas neste trabalho.

Os diagnósticos histopatológicos do colo uterino foram categorizados em: HSIL (do inglês *High-grade Intraepithelial Lesion* - Neoplasia Intraepitelial Cervical de Alto Grau ou NIC II e III) (n= 15) e controle (n=15).

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do INI/Fiocruz (CEP nº 35589314.0.0000.5262) e do IFF/Fiocruz (CEP nº 35589314.0.3001.5269).

5.1.2. Expressão *in situ* das MMPs e seus moduladores

Para observação e quantificação de células expressando MMPs e seus moduladores em material parafinado de lesões de colo uterino, foi realizada a técnica de imuno-histoquímica. Foram selecionadas 15 amostras de casos de HSIL e 15 de amostras controle, sem lesão. Para este procedimento, o material embocado em parafina foi cortado em micrótomo em seções de 3µm, e em seguida fixadas em lâminas de vidro silanizadas. Após um período mínimo de 24 horas em estufa, as lâminas foram utilizadas para a reação de imuno-histoquímica para o processo de desparafinização, seguido de dois banhos de xileno 100%, cada um com 10 minutos de duração. Posteriormente, foram realizados dois banhos sucessivos de etanol 100%, durante 10 minutos cada. Em seguida, foi feita a recuperação antigênica para facilitar o acesso do anticorpo ao epítipo alvo com a

utilização da solução de Trilogy (Cell Marque), em banho de água (FANEM, 102R) durante 45 minutos a uma temperatura de 95°C. Todas as etapas posteriores seguiram o protocolo descrito pelo fabricante do kit REVEAL Biotin-Free Polyvalent HRP (Spring Bioscience). Foi realizado o bloqueio da enzima peroxidase endógena com a solução de peróxido de hidrogênio. Com o objetivo de diminuir as ligações inespecíficas, foi utilizado o bloqueador de proteínas. Após isso, a amostra foi incubada com os anticorpos primários descritos na Tabela 1, por um período de 16 horas à 4°C. Na etapa seguinte, foi adicionado o anticorpo secundário por 15 minutos, e seguido pelo procedimento de 3 lavagens sucessivas na solução de PBS acrescida de Tween 20 0,05%. Posteriormente, adicionou-se o conjugado, e na etapa subsequente o DAB (Diaminobenzidina 3,3, Spring). As lâminas foram coradas com uma solução de hematoxilina de Meyers e submetidas a um banho de álcool e outro de xilol por 10 minutos cada. Após a secagem, as lâminas foram montadas com Etellan (MERCK) e o material recoberto com lamínulas. O último passo foi a observação das lâminas em microscopia óptica (marca, LEIKA - DMLB) com uma câmera acoplada para a captura das imagens em computador, no qual foram consideradas positivas as células que exibiram coloração acastanhada independente da intensidade de marcação. As áreas do estroma e epitélio foram analisadas independentemente para cada marcador, visando identificar alterações nestes marcadores no sítio da lesão causada pelo HPV. As células positivas foram contadas em 20 campos do epitélio e estroma (400x) do colo uterino utilizando um microscópio óptico com uma ocular gradeada.

Tabela 1. Anticorpos utilizados para avaliar a expressão *in situ* em amostras parafinadas

Anticorpo	Diluição	Marca
MMP-2	1:100	Santa Cruz
MMP-7	1:50	Santa Cruz
MMP-9	1:50	Santa Cruz
TIMP-2	1:50	Santa Cruz
TNF- α	1:500	Abcam
EphA2	1:200	R&D
EfrinaA1	1:50	Invitrogen

5.1.3. Análise estatística

Para a análise da expressão das MMPs, TIMP-2, EphA2, EfrinaA1 e TNF- α , foram utilizados o teste Mann-Whitney para comparar médias de células expressando os marcadores nas áreas do epitélio e estroma de mulheres com HSIL e sem lesão (grupo controle). Utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman para examinar as relações entre as variáveis analisadas no epitélio e córion. Foi considerado estatisticamente significativo os valores de $p < 0,05$.

5.2. Expressão de RNAm das MMPs e seus reguladores *in vitro* em linhagens de células cervicais

5.2.1. Cultivo das linhagens celulares e estimulação com TNF- α

Duas linhagens celulares foram cultivadas em dois experimentos independentes (em duplicata). HeLa (HATCC® CCL-2™) é uma linhagem originada de adenocarcinoma do colo uterino, com morfologia de célula epitelial, propriedade aderente e HPV 18 positiva; e C33A (ATCC® HTB-31™) é originada de carcinoma de colo, também com morfologia de célula epitelial e propriedade aderente, contudo, HPV negativa, sendo utilizada, neste estudo, para observação de possível modulação do HPV na expressão de MMPs e seus reguladores, quando estimuladas por TNF- α .

As linhagens foram cultivadas em garrafas de cultura celular contendo meio RPMI, suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% antibiótico e 1% de L-glutamina, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, a 37°C. O meio foi trocado a cada três dias e as células recultivadas sempre que atingiam 80% de confluência. Solução de tripsina a 0,05g/ml em PBS/EDTA foi utilizada para recuperação de células aderidas na garrafa para recultivo. Posteriormente, as células foram adicionadas em placas de 24 poços, com 5x10⁵ células por poço. Após 24h, as células foram estimuladas com diferentes doses de TNF- α (5, 10 ou 20 ng/ml), e incubadas por 6, 12, 24 e 48h, em triplicata. Células não estimuladas, contendo apenas o meio suplementado foram utilizados como controle.

5.2.2. Extração e purificação de RNA total

A extração do RNA total foi realizada utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen). O meio de cultura foi removido e os poços lavados 2 vezes com PBS. Após a lavagem adicionou-se 350 µl de tampão RLT nos primeiros poços para romper as células, sendo homogeneizadas com pipeta até que nenhum aglomerado celular fosse visível. O mesmo tampão RLT foi repassado em mais 3 poços iguais contendo 5×10^5 células/poço até se conseguir um lisado com quantidade de 2×10^6 células por amostra. Para completar a homogeneização e quebra de moléculas de DNA, a solução foi homogeneizada 5 vezes em uma seringa (9 mm) e, posteriormente, adicionado 350 µl de etanol 70% em cada triplicada, para que o RNA pudesse se ligar seletivamente à membrana da coluna. Após homogeneizar o etanol ao lisado, o volume total foi transferido para a coluna do kit e centrifugado por 15 seg/10000 x g. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 700 µl do tampão de lavagem RW1, sendo novamente centrifugado por 15 seg/10000 x g e descartado o sobrenadante. Adicionou-se 500 µl do tampão de lavagem RPE na mesma coluna, seguida de outra centrifugação, descartando o sobrenadante. Mais 500 µl de RPE foi adicionado e as amostras centrifugadas, agora por 2 min/10000 x g. Após o descarte do sobrenadante, uma centrifugação de 1 minuto foi realizada com a coluna vazia para eliminar quaisquer resíduos de RPE. As colunas foram inseridas em microtubos de 1,5 ml, e adicionado 40 µl de água ultrapura na coluna para ressuspender o RNA. As amostras foram centrifugadas por 1 min/10000 x g e o RNA foi eluído da coluna. Os RNAs foram colocados em temperatura ambiente por 1 minuto e armazenados em freezer -80°C.

Para a quantificação do RNA, foi utilizado um espectrofotômetro (BioPhotometer, Eppendorf), com leitura no comprimento de onda de 260 e 280 nm. Os RNAs que mostraram razão de absorbância 260/280nm próximos a 2, foram considerados de boa qualidade para a realização da síntese de cDNA.

5.2.3. Síntese de cDNA (transcrição reversa)

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen), a partir de 1 µg de RNA total, de acordo com o fabricante. A primeira etapa consistiu da eliminação do DNA genômico adicionando-se ao RNA das amostras 2 µl de *gDNAse Wipeout Buffer* e completando com água livre de RNase, chegando a um volume total de 14 µl por amostra, seguida de incubação em termociclador (Mastercycler, Eppendorf) por 2 min a 42°C. A segunda etapa consistiu na transcrição reversa adicionando-se 1 µl da enzima *Quantiscript Reverse Transcriptase*, 4 µl de *Quantiscript RT Buffer* (dNTPs) e 1 µl de *RT Primer Mix* (oligo-dT) em cada amostra, totalizando um volume de 20 µl, seguida de incubação por 30 min a 42°C e 3 min por 95°C. O cDNA foi armazenado em freezer -20°C.

5.2.4. Quantificação da expressão gênica por qPCR

A expressão gênica das metaloproteinases e seus reguladores foi analisada através da reação de PCR quantitativo (qPCR) através do sistema SYBR Green (Rotor-

Gene Sybr Green PCR kit – Qiagen), utilizando o aparelho Rotor-Gene Q (Qiagen). Os genes alvos estudados foram: *MMP-2*, *MMP-9*, *MMP-7*, *TIMP-2*, *EphA1*, *EfrinaA1* (Invitrogen) e *TNF- α* (Sigma). Contudo, para corrigir possíveis variações entre as amostras, primeiramente foi feita uma reação utilizando um gene de expressão constitutiva, o *HPRT1* (Sigma). Os *primers* foram desenhados através do Primer-Blast (Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e suas respectivas sequências estão demonstradas na Tabela 2.

Para a reação, foi utilizado 1 μ l do cDNA juntamente com 10 μ l de SYBR Green, 2 μ l do primer *forward* (10 μ M) e 2 μ l do primer *reverse* (10 μ M) do gene e 5 μ l de água livre de RNase, chegando a um volume final de reação de 20 μ l. A reação compreende uma etapa inicial de 95°C por 5 minutos, desnaturação por 95°C por 5 segundos e 40 ciclos (para *HPRT1* e *TNF- α*) ou 60 ciclos (*MMPs* e seus reguladores) de anelamento e extensão a 60°C por 10 segundos. Os Cts para cálculo de expressão gênica foram definidos na fase lag de amplificação, através de um threshold de 0.04, de acordo com uma escala de fluorescência normalizada pelo Rotor Gene Q. Uma curva de *melting* foi realizada ao fim das corridas para verificar a especificidade dos amplicons gerados.

Tabela 2. *Primers* usados no qPCR para quantificar a expressão de RNAm em linhagens celulares

Gene	Primer	Sequência
HPRT1	Forward	5' -TGGACAGGACTGAACGTCT- 3'
	Reverse	5' -ATCCAGCAGGTCAGCAAAGA- 3'
MMP-2	Forward	5' -CGCCCATCATCAAGTTCCC- 3'
	Reverse	5' -AAGGTGTTTCAGGTATTGCACTG- 3'
MMP-9	Forward	5' -TTCTGCCCCGGACCAAGGATA- 3'
	Reverse	5' -ACATAGGGTACATGAGCGCC- 3'
MMP-7	Forward	5' -TGGGAACAGGCTCAGGACTAT- 3'
	Reverse	5' -TTGCATCTCCTTGAGTTTGGC- 3'
TIMP-2	Forward	5' -GTTTATCTACACGGCCCCCT- 3'
	Reverse	5' -TCGGCCTTTCCTGCAATGAG- 3'
EphA2	Forward	5' -AGGGCAAGGAAGTGGTACTG- 3'
	Reverse	5' -TTTGCCATACGGGTGTGTGA- 3'
EfrinaA1	Forward	5' -GCTACTACTACATCTCTCACAGTCC- 3'
	Reverse	5' -TGCTATGTAGAACCCGCACC- 3'
TNF- α	Forward	5' -GCTGCACTTTGGAGTGATCG- 3'
	Reverse	5' -TCGAGAAGATGATCTGACTGCC- 3'

A expressão gênica foi calculada através da normalização das amostras com um gene constitutivo, *HPRT1*, e amostra controle, baseada no método $\Delta\Delta C_t$. Para analisar o efeito do estímulo de TNF- α na expressão gênica de MMPs e moduladores, em HeLa e C33A independentemente, o ΔC_t da amostra teste ($\Delta C_{t_{amostra}}$) foi calculado inicialmente subtraindo-se o valor de C_t do gene alvo pelo C_t do gene constitutivo da amostra teste. O ΔC_t do controle não estimulado ($\Delta C_{t_{controle}}$) foi calculado subtraindo-se a o valor da média da triplicata do C_t do gene alvo subtraído pela média da triplicata do C_t do gene constitutivo; o $\Delta\Delta C_t$ foi calculado através da fórmula [$\Delta C_{t_{amostra}}$ -

$\Delta Ct_{\text{controle}}$], e por fim, o resultado da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ resultará na expressão relativa do gene.

Para analisar se a presença de HPV interfere ou não na produção de MMPs e moduladores sob estímulo de TNF- α , a linhagem C33A foi utilizada como controle. O ΔCt da amostra teste ($\Delta Ct_{\text{amostra}}$) foi calculado inicialmente subtraindo-se o valor de Ct do gene alvo do valor do Ct do gene constitutivo em HeLa; o ΔCt do controle ($\Delta Ct_{\text{controle}}$) foi calculado subtraindo-se a média da triplicata do Ct do gene alvo pela média da triplicata do Ct do gene constitutivo em C33A (sem estímulo); o $\Delta\Delta Ct$ foi calculado através da fórmula [$\Delta Ct_{\text{amostra}} - \Delta Ct_{\text{controle}}$], e por fim, o resultado da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ resultará na expressão relativa do gene.

5.2.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o teste two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, através do software GraphPad Prism 7.0. A significância foi definida como $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média e desvio padrão.

6. RESULTADOS

6.1. Casuística

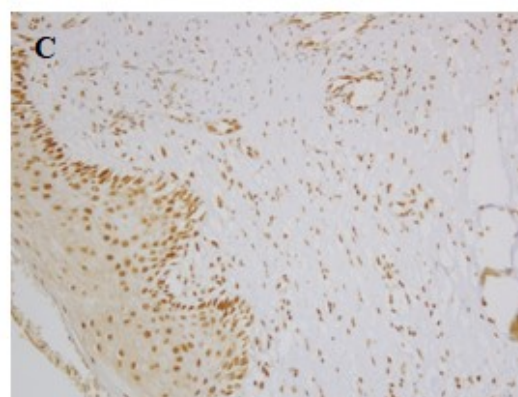
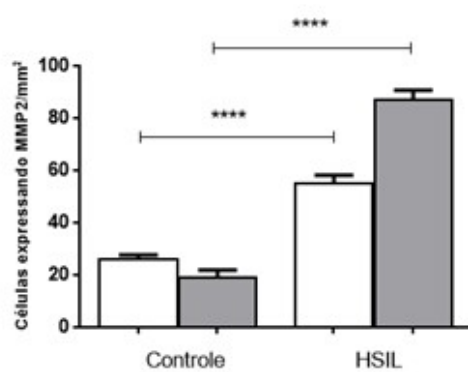
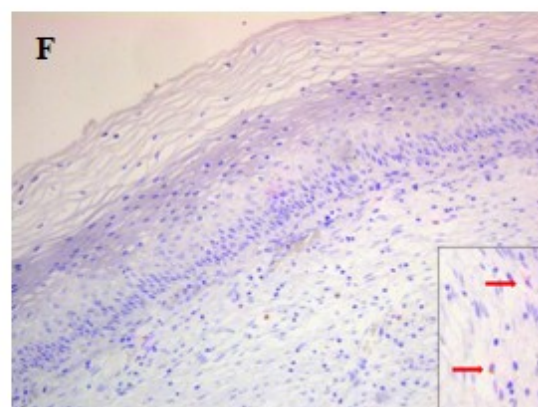
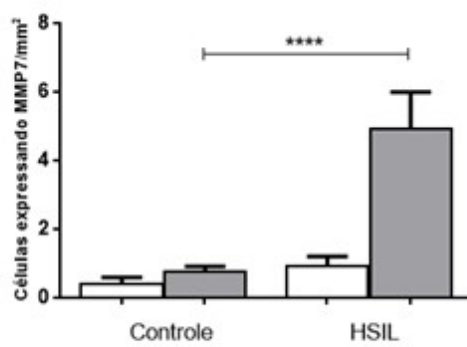
Trinta biópsias foram obtidas de pacientes com HSIL (n=15) e de mulheres saudáveis, sem lesão no colo uterino (n=15 controles). A idade das mulheres variou de 38 a 57 anos ($44,7 \pm 7,1$) no grupo controle (histerectomizadas) e de 24 a 50 anos ($34,5 \pm 8,3$) no grupo HSIL, com diferença estatística entre os grupos ($p=0,005$).

6.2. Expressão de MMP-2, -7 e -9 no colo uterino

A média do número de células expressando MMPs no colo uterino de mulheres com HSIL variou de 38,6 a 108,8 ($71 \pm 20,8$), de 0 a 11,9 ($2,9 \pm 3,5$) e de 0,4 a 15,9 ($7,3 \pm 5,1$) células/mm² para MMP-2, -7 e -9, respectivamente. No grupo controle, este número variou de 6,4 a 42,2 ($22,4 \pm 9,9$), de 0 a 2,8 ($0,5 \pm 0,7$) e de 0 a 7,1 ($2,1 \pm 2$) células/mm² para MMP-2, -7 e -9, respectivamente.

As áreas do estroma e epitélio foram analisadas independentemente para cada marcador, visando identificar alterações destes marcadores no sítio da lesão causada pelo HPV. No estroma, as pacientes com HSIL apresentaram maior número de células expressando MMPs em comparação com o grupo controle; sendo 4,6 vezes maior para MMP-2 ($87 \pm 13,8$ e $18,9 \pm 11,3$; $p < 0,0001$); 7,0 vezes maior para MMP-7 ($4,9 \pm 4$ e $0,7 \pm 0,6$; $p < 0,0004$) e 3,0 vezes maior para MMP-9 ($11,1 \pm 3,8$ e $3,6 \pm 1,8$; $p < 0,0001$). No epitélio, a expressão de MMP-2 foi 2 vezes maior no grupo HSIL em relação ao grupo controle ($54,9 \pm 12,4$ e $25,8 \pm 7$; $p < 0,0001$), enquanto que em MMP-9 foi de 6,8 vezes maior em HSIL em comparação com controle ($3,4 \pm 3$ e $0,5 \pm 0,5$, respectivamente;

$p < 0,0003$). Não houve diferença estatística na expressão de MMP-7 no epitélio entre os dois grupos (Figura 4). De uma forma geral, as células apresentando marcação para estas MMPs no estroma eram, principalmente, células inflamatórias e fibroblastos. Contudo, houve um número marcante de células expressando MMP-2 no primeiro terço do epitélio, porém, em locais mais distantes do epitélio e dos focos inflamatórios, essa expressão foi diminuída. Houve também presença de células endoteliais positivas para MMP-9 e EphA2.

A**D**

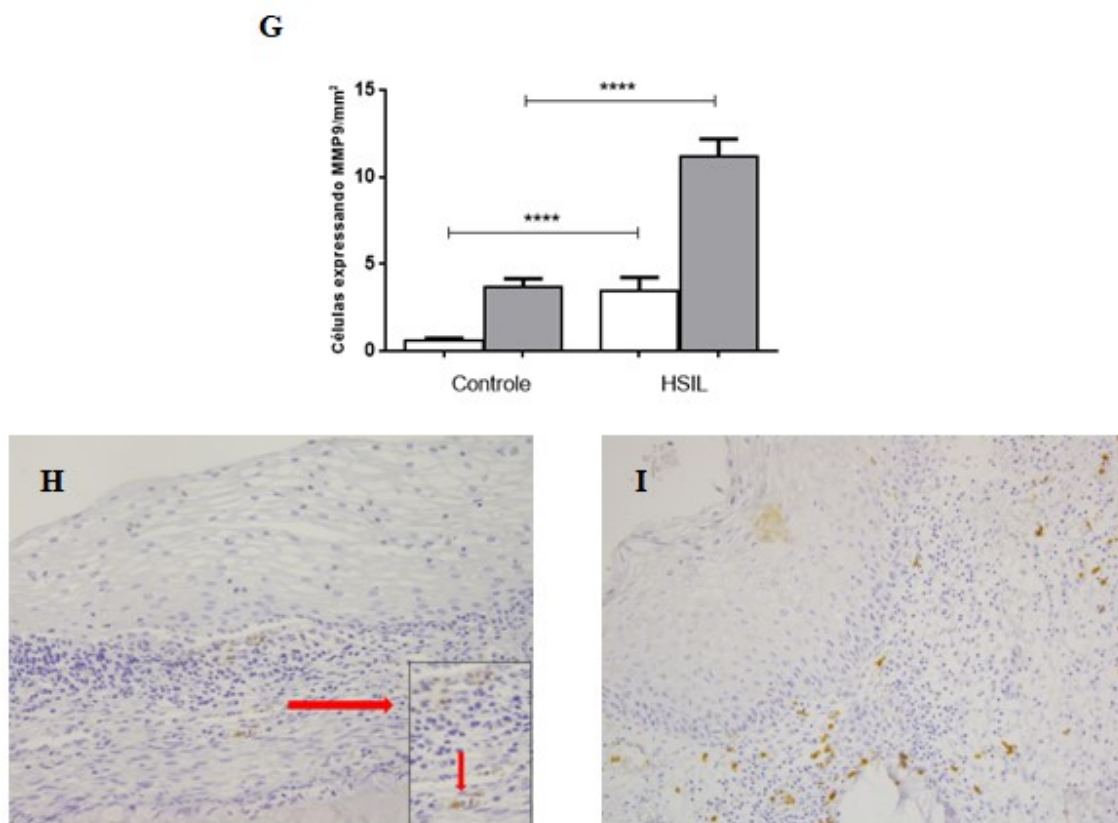


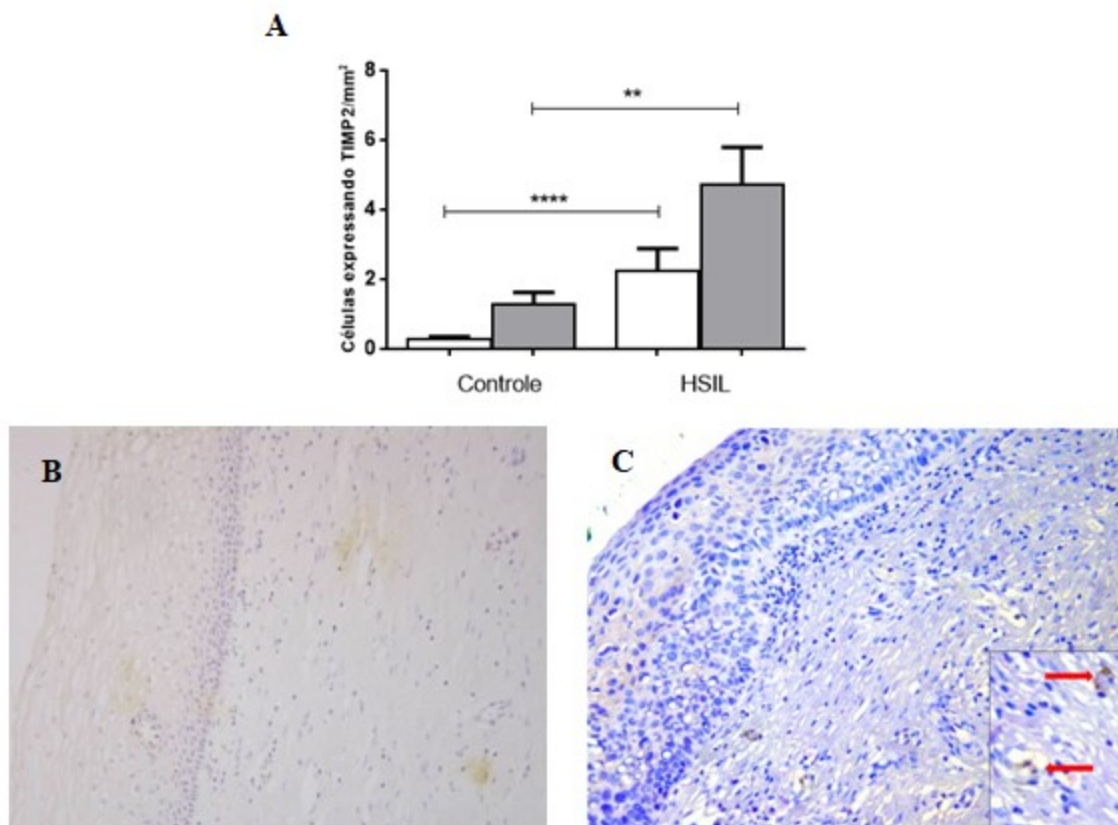
Figure 4: Distribuição de células expressando MMP-2 (A), MMP-7(D) e MMP-9 (G) em amostras de colo uterino de mulheres sem lesão cervical, grupo controle (B, E e H) e amostras de colo uterino com HSIL (C, F e I). O número de células positivas foi demonstrado no epitélio (barra branca) e estroma (barra cinza). Setas vermelhas mostrando células positivamente marcadas. (Aumento de 200x).

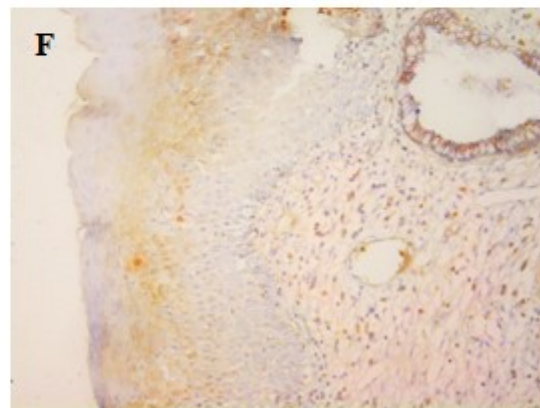
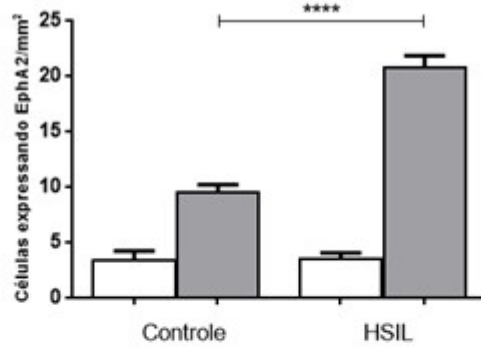
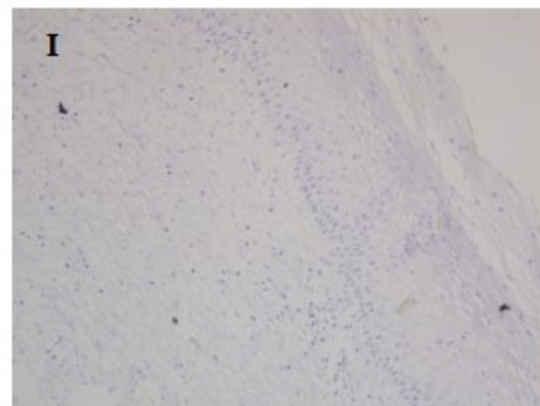
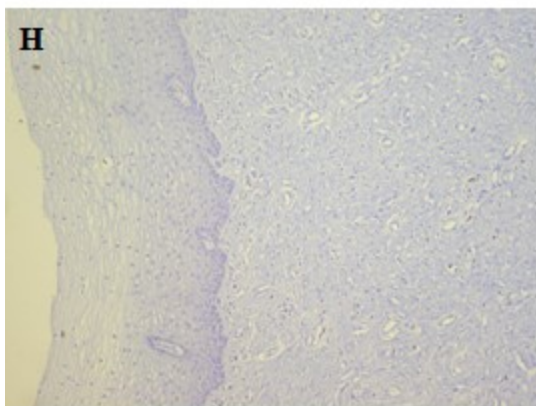
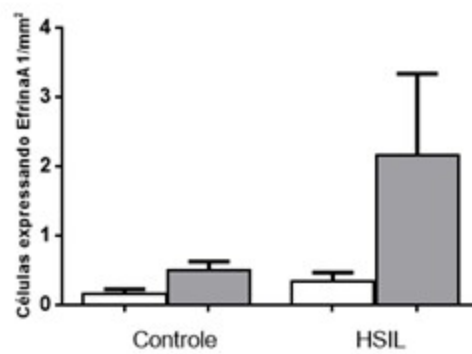
6.3. Expressão dos moduladores das MMPs - TIMP-2, EphA2, EfrinaA1 e TNF- α no colo uterino

A variação da média nas células expressando esses moduladores no grupo HSIL foi de 0 a 11,8 ($3,4 \pm 3,5$), 0,8 a 29,3 ($12,1 \pm 9,3$), 0 a 17,4 ($1,2 \pm 3,3$) e 0 a 13,7 ($1,1 \pm 2,6$) células/mm² e no grupo controle foi de 0 a 5,8 ($0,7 \pm 1,1$), 0,7 a 13,5 ($6,4 \pm 4,2$), 0 a 1,4 ($0,3 \pm 0,4$) e 0 a 2,6 ($0,4 \pm 0,6$), respectivamente para TIMP-2, EphA2, EfrinaA1 e TNF- α (Figura 5).

Na área do estroma, células expressando TIMP-2 foram 4 vezes maior em HSIL em relação ao controle ($4,7 \pm 4,1$ e $1,2 \pm 1,4$, respectivamente; $p < 0,02$); assim como em EphA2 foi 2,2 vezes maior em HSIL em relação ao controle ($20,7 \pm 4$ e $9,4 \pm 2,8$, respectivamente; $p < 0,0001$). Não foi observada diferença estatística na distribuição das células expressando EfrinaA1 e TNF- α entre os dois grupos (Figura 5).

No epitélio, uma diferença significativa foi observada apenas na distribuição de células expressando TIMP-2, sendo 11 vezes maior no grupo HSIL em relação ao controle ($2,2 \pm 2,4$ e $0,2 \pm 0,2$, respectivamente; $p < 0,0003$). Não foi observada diferença estatística na distribuição em EphA2, EfrinaA1 e TNF- α entre os grupos (Figura 5).



D**G**

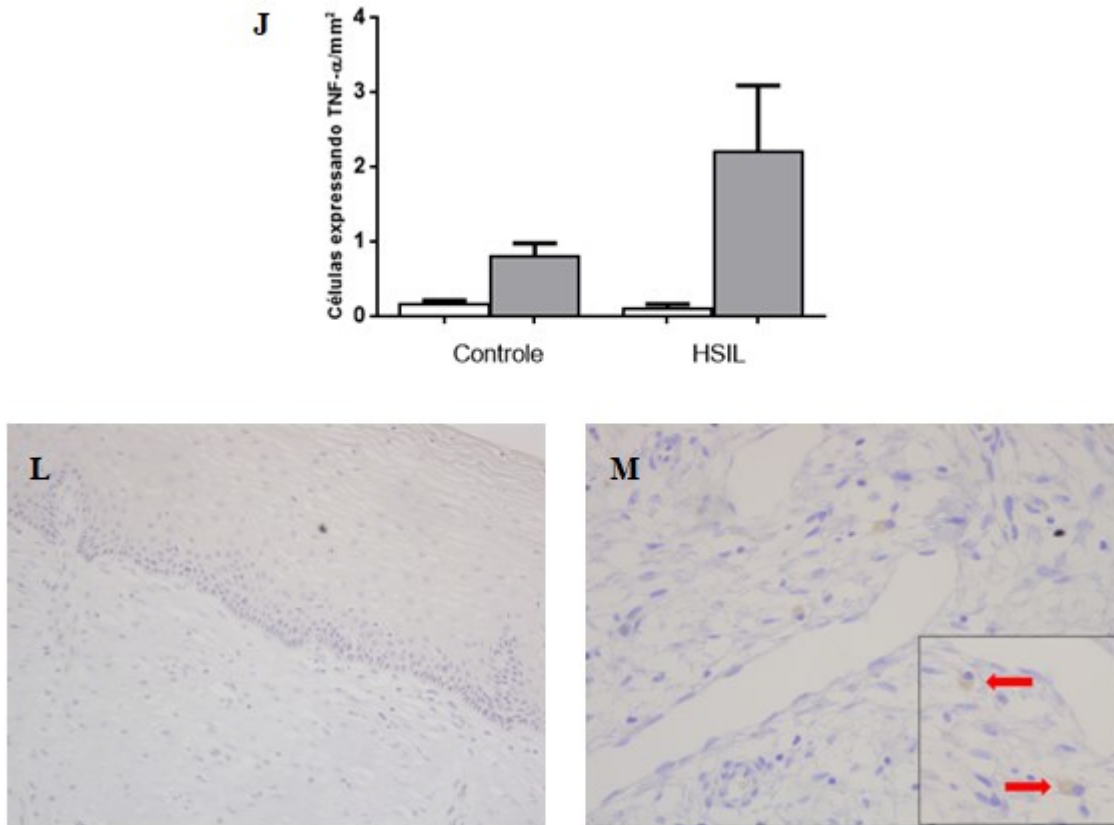


Figura 5: Distribuição de células expressando os TIMP-2 (A), EphA2 (D), EfrinA1(G) e TNF- α (J) em amostras de colo uterino de mulheres sem lesão cervical, grupo controle (B, E, H e L) e amostras de colo uterino com HSIL (C, F, I e M). O número de células positivas foi demonstrado no epitélio (barra branca) e estroma (barra cinza) Setas vermelhas mostrando células positivamente marcadas. (Aumento de 200x, exceto TNF- α 400x).

Uma análise de correlação foi feita para avaliar as relações entre as MMPs avaliadas, MMPs e seus moduladores e entre os moduladores. Uma correlação moderada negativa foi encontrada entre MMP-9 e TNF- α na área do estroma do grupo HSIL ($r=-0,517$; $p<0,04$) (Figura 6 A), e no epitélio do mesmo grupo, foi encontrada uma correlação moderada positiva entre MMP-9 e EfrinaA1 ($r= 0,550$; $p<0,03$) (Figura 6 B). Não houve correlação nos demais marcadores.

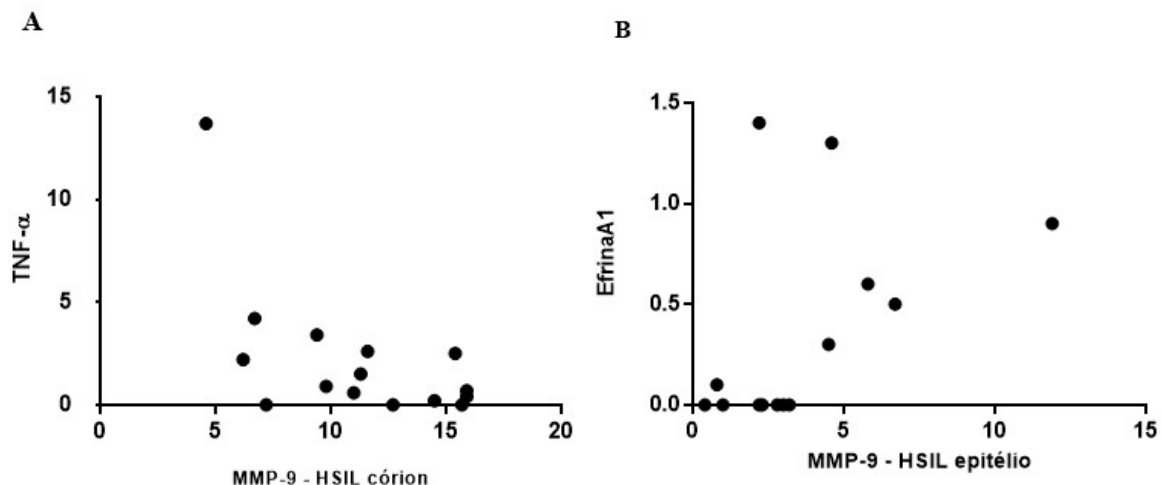


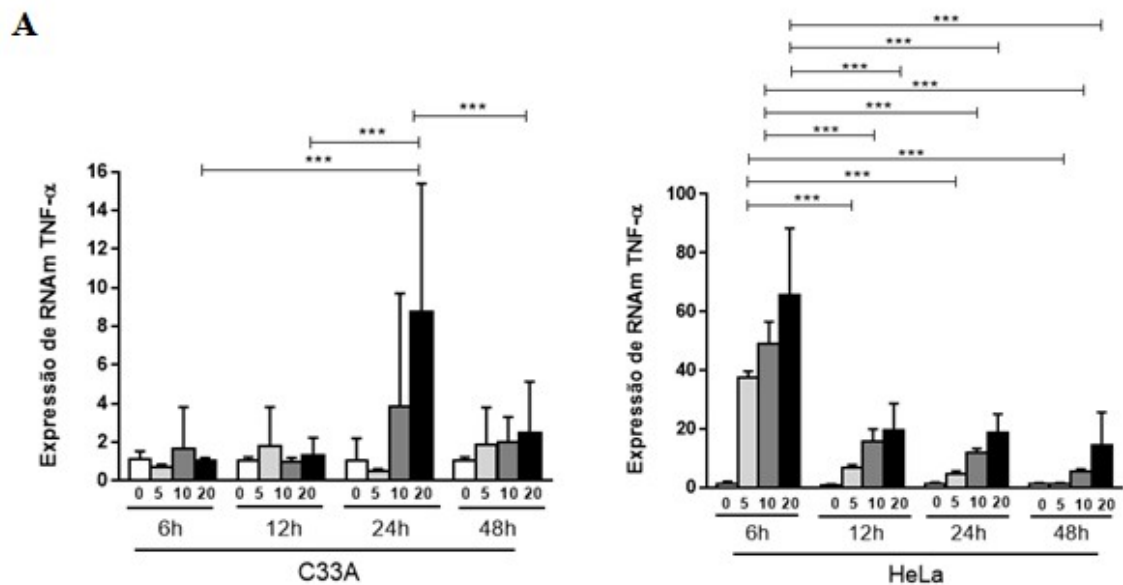
Figura 6: Análise de correlação avaliando a relação entre a expressão de MMPs e seus moduladores no epitélio e no estroma. (A) MMP-9 e TNF- α ($p < 0,04$) e (B) MMP-9 e EfrinaA1 ($p < 0,03$).

6.4. Expressão de RNAm de MMP-2, -9, -7, TNF- α , TIMP-2, EphA2 e EfrinaA1 em linhagens cervicais

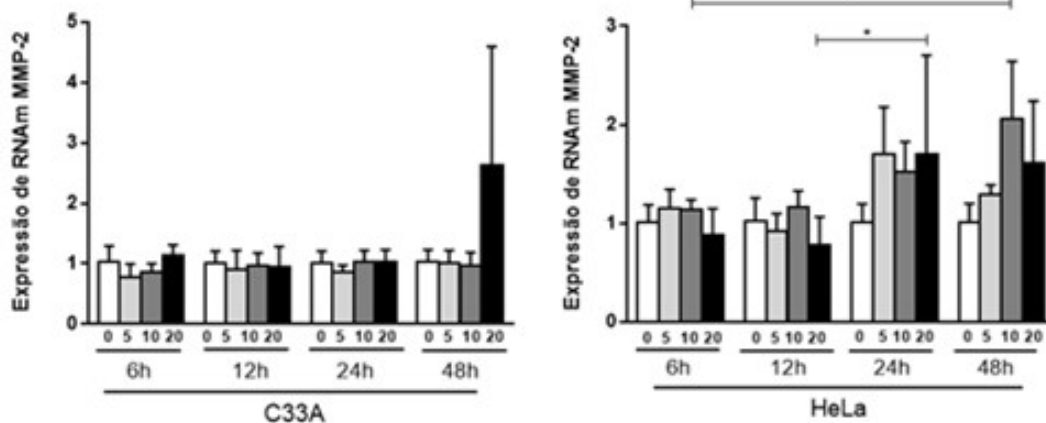
Para demonstrar o papel de TNF- α na modulação da expressão das MMPs e moduladores, primeiramente avaliamos a expressão gênica de cada MMP e modulador de forma independente em HeLa e C33A.

A C33A (HPV negativa) apresentou resposta significativa com relação à expressão gênica de TNF- α em 24h de estímulo com TNF- α sob a dose de 20ng, com diferença estatística entre os tempos 6h ($p < 0,01$), 12h ($p < 0,01$) e 48h ($p < 0,01$). Em relação à expressão de MMP-2, MMP-9 e MMP-7, não houve resposta ao estímulo de TNF- α (Figura 7). Um aumento na expressão de MMP-2 e MMP-9 foi observado em 48h de estímulo a 20ng, contudo, uma vez que cada estímulo foi realizado em triplicata, acredita-se uma das amostras tenha sido super reativa, levando a esse aumento isolado na expressão destas duas enzimas, não se tratando, portanto, de um aumento real.

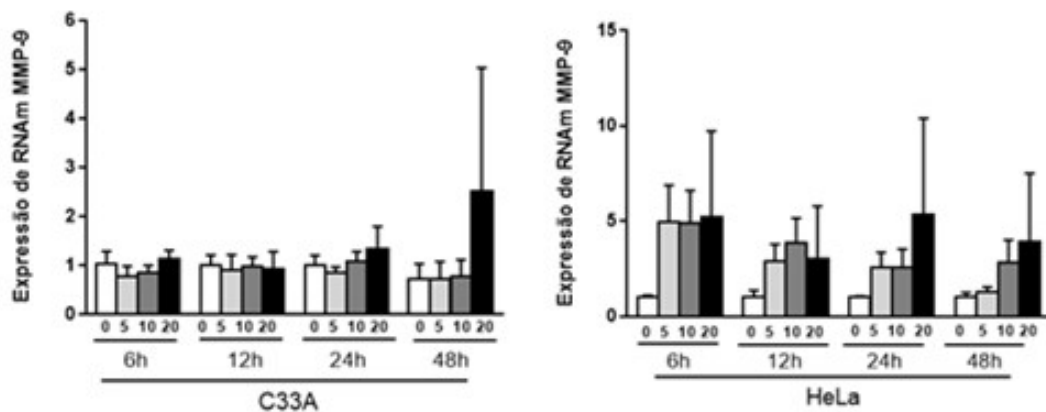
A HeLa (HPV 18) apresentou um aumento na expressão gênica de *TNF- α* , de uma maneira dose dependente, em 6h de estímulo com *TNF- α* . Após este tempo, houve uma queda na expressão desta citocina. Diferenças estatísticas foram encontradas nas doses de 5, 10 e 20ng entre os tempos 6h e 12h ($p<0,0001$), 6h e 24h ($p<0,0001$) e 6h e 48h ($p<0,0001$). Além disso, foi observado aumento de expressão de *MMP-2* nos tempos 24h e 48h, com diferença estatística entre 6h e 48h sob dose de 10ng ($p<0,05$) e 12h e 48h sob dose de 20ng ($p<0,05$). Para *MMP-9*, um aumento na expressão foi observado principalmente em 6h de estímulo independente da dose, porém, sem diferença estatística. Por fim, foi observado aumento de *MMP-7* em resposta à estimulação, com diferença estatística apenas entre 6h e 24h de estímulo, sob dose de 10ng ($p<0,05$) (Figura 7).



B



C



D

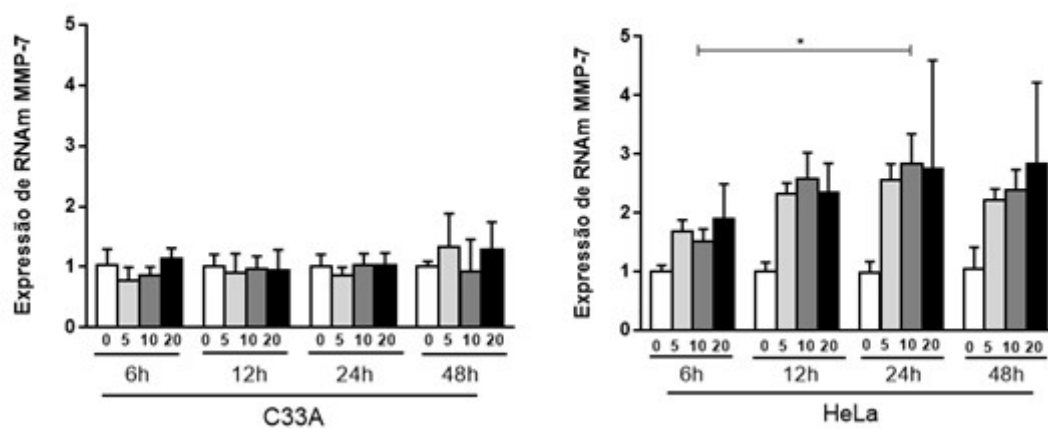
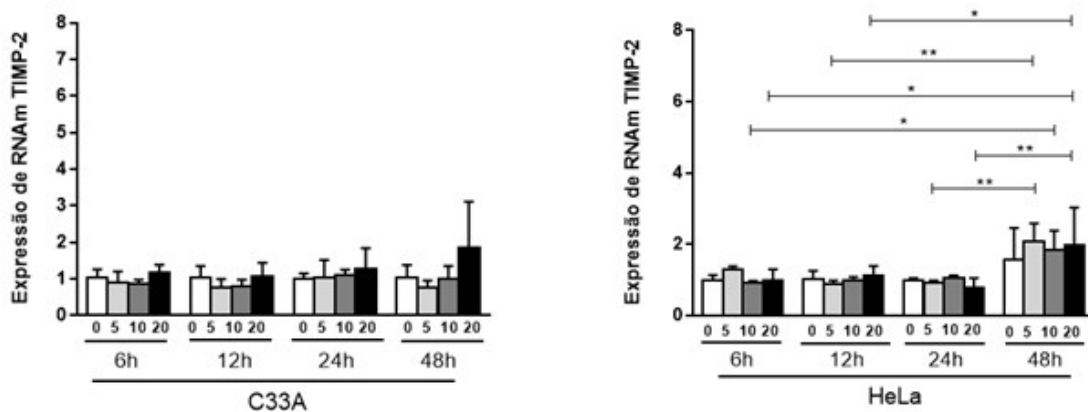


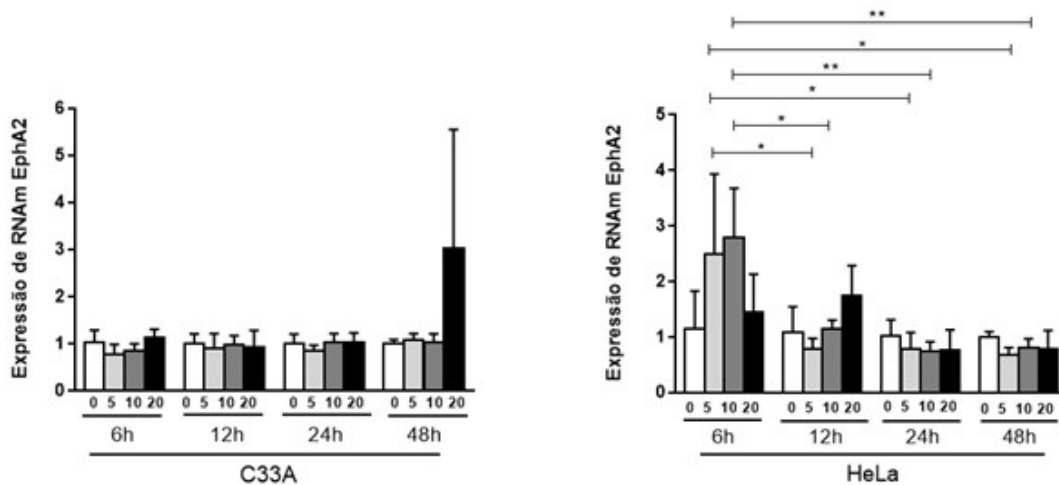
Figura 7: Expressão de RNAm de TNF- α (A), MMP-2 (B), MMP-9 (C) e MMP-7 (D), avaliada por qPCR em linhagem HPV negativa (C33A) e linhagem HPV 18 positiva (HeLa) sob estímulo de TNF- α nas doses de 5, 10 e 20ng. Todas as amostras foram normalizadas pelo gene constitutivo. *HPRT1*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Com relação à expressão gênica de *TIMP-2*, a C33A não apresentou resposta ao estímulo com TNF- α . Da mesma forma, C33A não respondeu ao estímulo em relação expressão de *EphA2* (presença de amostra super reativa assim como *MMP-2* e -9). Por fim, foi observado um leve aumento na expressão de *EfrinaA1*, independente do tempo, com uma maior expressão sob dose de 20ng, porém, sem diferenças estatisticamente significativas (Figura 8). Contudo, em HeLa, foi observado um leve aumento na expressão gênica de *TIMP-2* em 48h de estímulo, havendo diferença estatística entre os tempos 24h e 48h ($p<0,001$), 12h e 48h ($p<0,001$) sob dose de 5ng; entre 6h e 48h ($p<0,05$) sob a dose de 10ng; e entre 6h e 48h ($p<0,05$), 12h e 48h ($p<0,05$) e 24h e 48h ($p<0,001$) sob a dose de 20ng. Com relação a *EphA2*, foi observado um leve aumento de expressão em 6h de estímulo com TNF- α , onde diferenças estatísticas foram observadas entre os tempos 6h e 12h ($p<0,05$), 6h e 24h ($p<0,05$) e 6h e 48h ($p<0,05$) sob as doses de 5ng; e 6h e 12h ($p<0,05$), 6h e 24h ($p<0,01$) e 6h e 48h ($p<0,01$) sob a dose de 10ng. Foi observado um aumento da expressão de *EfrinaA1* em 12h de estímulo e dose-dependente, com diferenças estatísticas observadas entre os tempos 6h e 12h ($p<0,001$), 12h e 48h ($p<0,001$) sob a dose de 10ng, e entre 12h e 48h sob a dose de 20ng ($p<0,01$) (Figura 8).

A



B



C

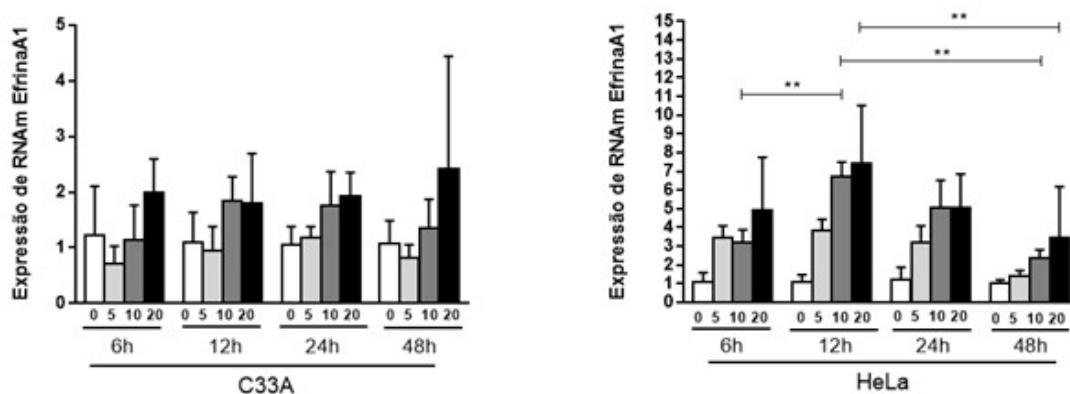
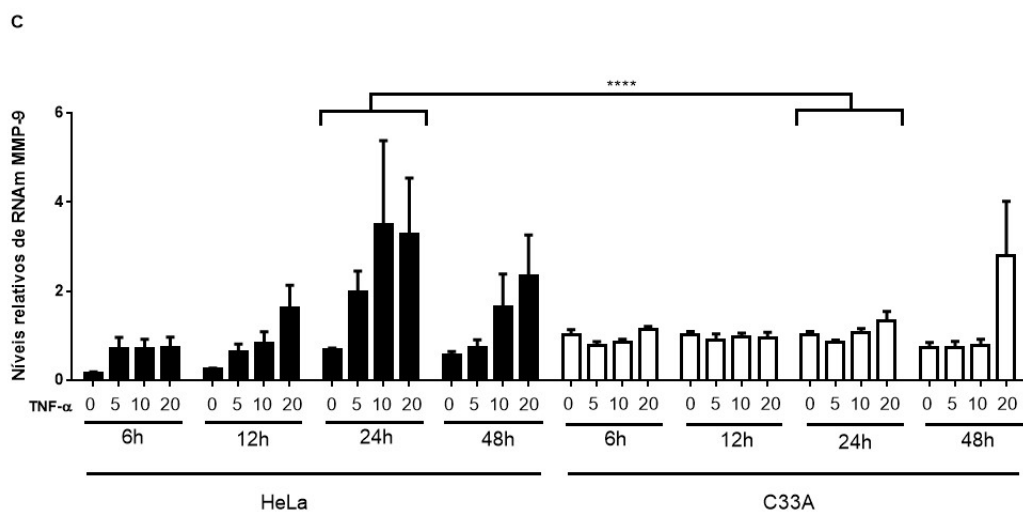
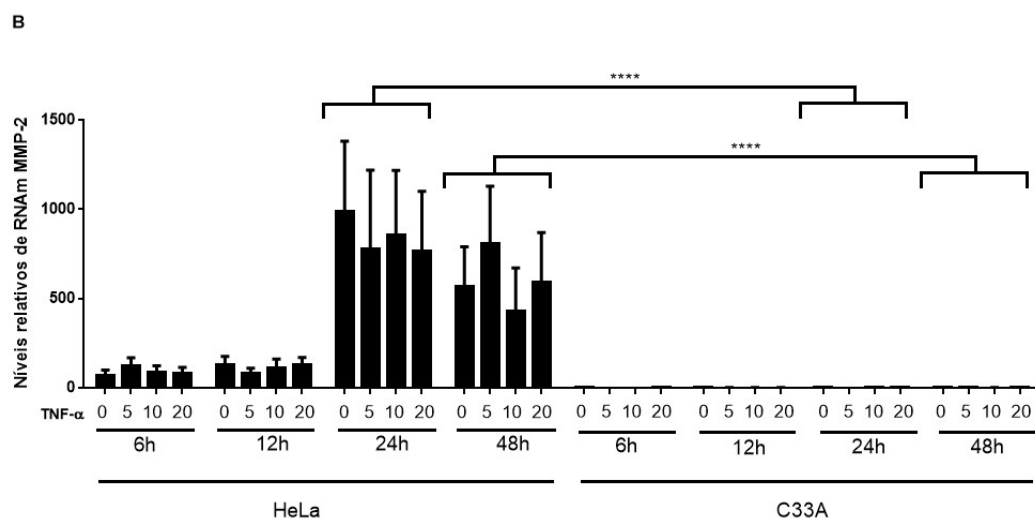
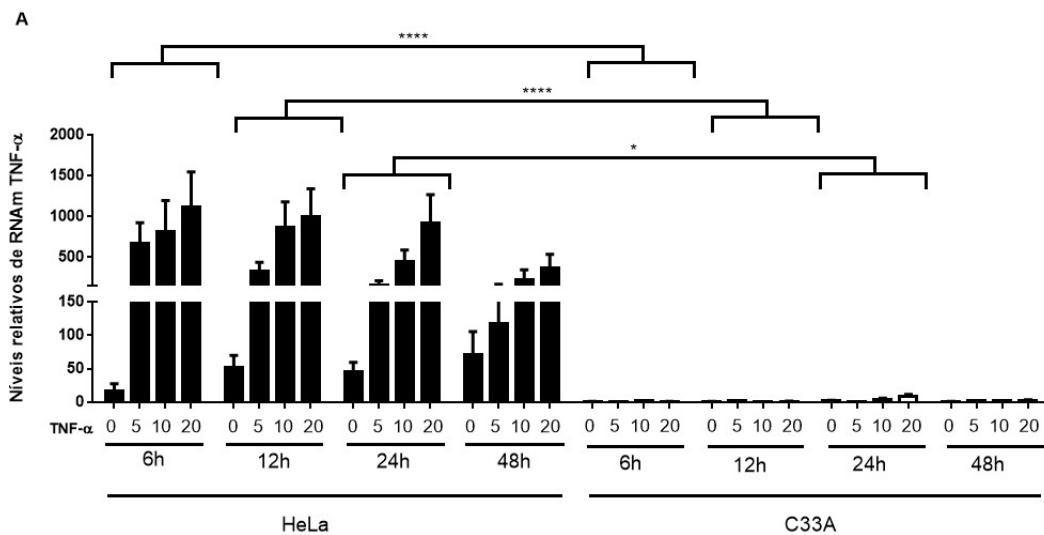


Figura 8: Expressão de RNAm de TIMP-2 (A), EphA2 (B) e EfrinaA1 (C), avaliada por qPCR em linhagem HPV negativa (C33A) e linhagem HPV 18 positiva (HeLa) sob estímulo de TNF- α nas doses de 5, 10 e 20ng. Todas as amostras foram normalizadas pelo gene constitutivo, *HPRT1*. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,0001.

Resumidamente, podemos observar que a linhagem C33A não apresentou resposta ao estímulo de TNF- α com relação à expressão gênica das MMPs. Com relação aos moduladores, foi observada expressão gênica significativa apenas de *TNF- α* , não apresentando resposta aos demais moduladores após o estímulo. Diferentemente, HeLa apresentou resposta ao estímulo com TNF- α em relação a expressão gênica das MMPs, com relação aos moduladores, apresentou nível significativamente maior de expressão gênica de *TNF- α* , e leve aumento da expressão dos demais moduladores, *TIMP-2*, *EphA2* e *EfrinaA1*.

Para demonstrar se a presença do HPV pode estar interferindo na expressão de MMPs e moduladores, a linhagem HPV negativa, C33A, foi utilizada como controle, sendo os dados analisados e expressos como níveis relativos comparados com esta linhagem.

Após estímulo por TNF- α , a linhagem Hela apresentou um aumento na expressão gênica de *TNF- α* em até 1000 vezes, em média, em comparação com C33A (6h, $p < 0,0001$; 12h, $p < 0,0001$ e 24h, $p < 0,05$). Foi observado um aumento tardio na expressão de *MMP-2* em até 1000 vezes, em média, com relação a C33A, contudo, essa expressão não sofreu alteração após estímulo com TNF- α (24h, $p < 0,0001$; 48h, $p < 0,0001$). *MMP-9* foi significativamente mais expresso com 24h de estímulo, sendo essa expressão cerca de 3,5 vezes maior em comparação com C33A (24h, $p < 0,0001$). *MMP-7*, por sua vez, apresentou um aumento da expressão gênica em até 46 vezes, em média, em relação a C33A, após o estímulo com TNF- α (6h, $p < 0,001$; 24h, $p < 0,0001$; 48h, $p < 0,0001$) (Figura 9).



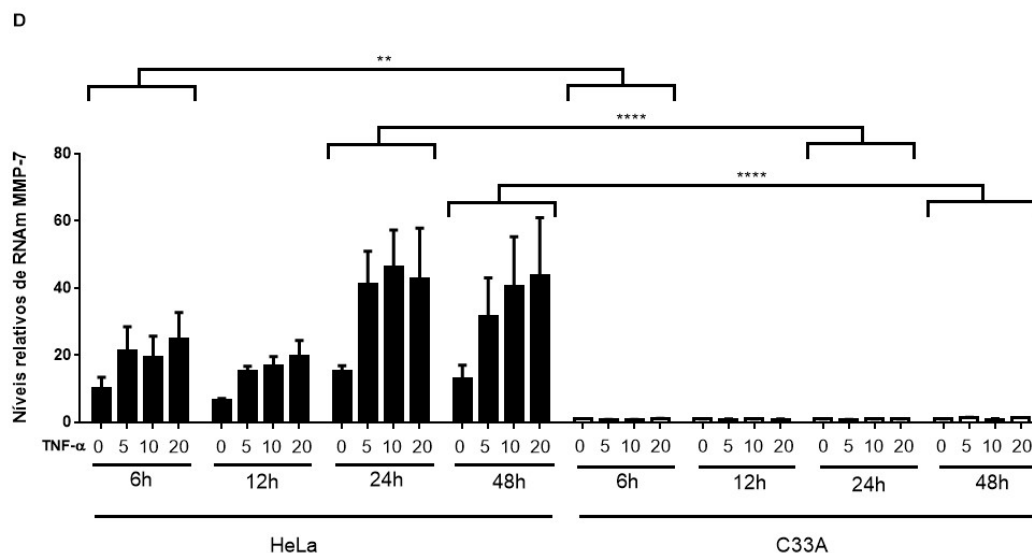


Figura 9: Expressão relativa de RNAm de TNF- α (A), MMP-2 (B), MMP-9 (C) e MMP-7 (D), avaliada por qPCR, em linhagem cervical HPV positiva, HeLa, sob estímulo de TNF- α nas doses de 5, 10 e 20ng. Os dados foram normalizados em relação ao gene constitutivo *HPRT1* e expressos como níveis relativos comparados a linhagem HPV negativa, C33A. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,00001$

Com relação aos moduladores, HeLa apresentou aumento de expressão gênica de *TIMP-2* independente do estímulo com TNF- α , sendo em média 25 vezes maior em relação a C33A ($p < 0,0001$, para todos os tempos), contudo, houve uma leve diminuição da expressão de *TIMP-2* no tempo de 48h de estimulação ($p < 0,0001$). *EfrinaA1* apresentou expressão aumentada em até 130 vezes, em média, em relação a C33A, sendo mais expresso em 6h e 12h de estimulação ($p < 0,0001$; $p < 0,001$), seguido de uma diminuição significativa em 24h e 48h ($p < 0,001$). Não houve diferença de expressão de *Epha2* em HeLa e C33A em qualquer tempo (Figura 10).

É importante observar que em amostras sem estímulo, houve expressão de RNAm de todos os marcadores, com exceção da *MMP-9* e *Epha2*, em relação as amostras sem estímulo de C33A, exceto de *Epha2*. Isto demonstra que HeLa por si só é capaz de apresentar uma expressão significativa destes marcadores. Sendo esta uma linhagem HPV 18 positiva, sugerimos que a presença de oncoproteínas deste subtipo de alto risco pode estar exercendo influência nesta expressão.

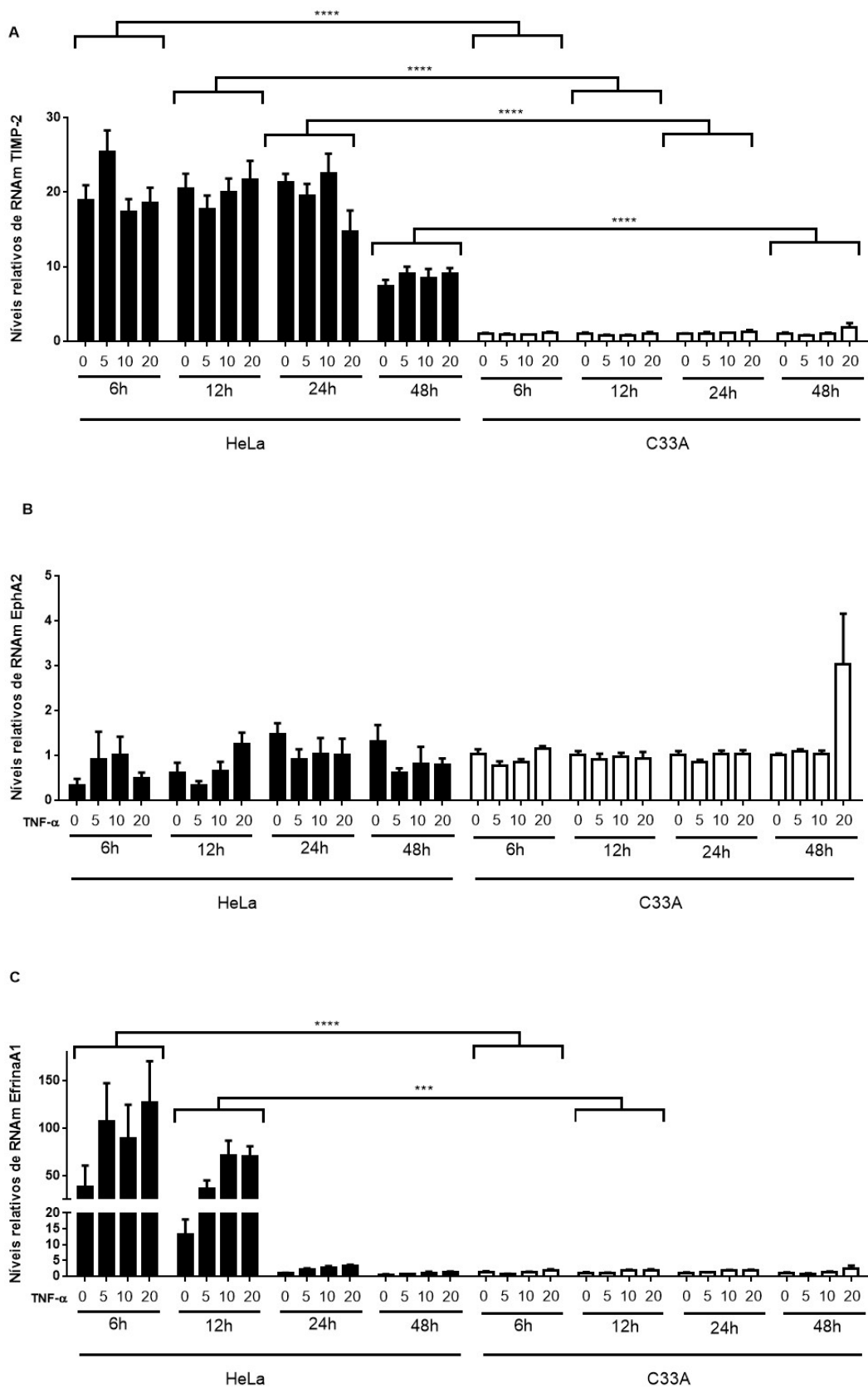


Figura 10: Expressão relativa de RNAm de TIMP-2 (A), EphA2 (B) e EfrinaA1 (C), avaliada por qPCR, em linhagem cervical HPV positiva, HeLa, sob estímulo de TNF- α nas doses de 5, 10 e 20ng. Os dados foram normalizados em relação ao gene constitutivo *HPRT1* e expressos como níveis relativos comparados a linhagem HPV negativa, C33A. * $p < 0,05$

7. DISCUSSÃO

Algumas características da carcinogênese como a migração, invasão, metástase e angiogênese são dependentes do microambiente circundante, onde ocorre a interação de células tumorais com a MEC, além de algumas citocinas, fatores de crescimento e células residentes (178). Sendo as MMPs as principais enzimas responsáveis pela degradação tecidual facilitando a invasão das células tumorais, nosso estudo buscou avaliar a presença destas enzimas, assim como alguns de seus moduladores, em lesões do colo uterino, bem como a expressão gênica destes marcadores em linhagens celulares infectadas ou não por HPV.

É descrito na literatura que algumas MMPs, principalmente as MMPs-2 e -9, estão associadas com desenvolvimento de CC. Segundo estes estudos, a expressão de MMP-2 aumenta com a progressão da lesão, sendo a expressão em HSIL e CC de moderada a forte, e a expressão em LSIL e colo normal muito baixa ou ausente (179–181). Neste trabalho, mostramos que o número de células positivas expressando MMP-2 foi abundante em HSIL, principalmente na área do estroma. Corroborando com nossos achados, Gaiotto e colaboradores (2003) (180) demonstraram uma baixa expressão em tecidos normais e LSIL, e alta expressão em HSIL e CC, principalmente em células estromais. Em contrapartida, Davidson (1999) (182) e Talvensaaari-Matilla (1998) (183) e colaboradores não observaram diferença estatística na expressão de MMP-2 em HSIL quando comparado com grupo controle. Ainda sobre MMP-2, observamos uma importante distribuição de células expressando essa enzima no primeiro terço do epitélio, onde há uma intensa proliferação, e no estroma, em regiões compostas principalmente por células inflamatórias. Em regiões mais afastadas do epitélio e dos

focos inflamatórios, a expressão foi diminuída. Estes dados corroboram com os achados de Brummer e colaboradores (2000) (181), que ressaltam que a reação inflamatória é capaz de induzir a ativação de MMP-2, uma vez que a transcrição destas enzimas pode ser regulada por citocinas pró-inflamatórias (184).

Embora a maioria dos estudos relate expressão rara ou ausente de MMP-2 na cérvix normal, nós observamos uma expressão desta enzima em amostras controles, principalmente no primeiro terço e na camada mais superficial do epitélio, e pouca expressão na área do estroma, com menor intensidade de coloração. Diante deste achado, vale ressaltar que esta enzima é constitutivamente expressa, de forma controlada, por células do estroma na maioria dos tecidos (185,186).

Assim como a MMP-2, encontramos maior expressão de MMP-9 no estroma em relação ao epitélio, principalmente no grupo HSIL, contudo, o número de células expressando estes marcadores foi significativamente menor em comparação com MMP-2. Este resultado vai, em parte, de acordo com Westin e colaboradores (2015) (187), que observaram uma maior expressão de MMP-9 em células estromais em NIC3 e carcinoma invasor, enquanto que MMP-2 teve maior expressão tanto em células estromais quanto tumorais em carcinoma invasivo, sugerindo que MMP-2 possa ter um papel na progressão neoplásica da lesão, enquanto que MMP-9 deve atuar na interação entre as células estromais e tumorais. Esta interação também foi sugerida por Matheus e colaboradores (2014) (188), que demonstraram, em esfregaços cervicais, intensa positividade de MMP-9 em células normais adjacentes às células discarióticas, de acordo com a progressão da lesão, sugerindo que células tumorais induzem a produção de MMP-9 pelas células vizinhas, ressaltando a importância da interação célula-célula durante a progressão tumoral. Em adição, encontramos positividade para MMP-9 em células endoteliais do grupo HSIL, reforçando seu papel como uma das principais

MMPs reguladoras da angiogênese, uma vez que é capaz de ativar fatores angiogênicos, como VEGF, FGF e TGF- β (140).

A MMP-7, por sua vez, é a menos estudada no contexto do CC. Um estudo recente observou uma alta expressão de MMP-7 na membrana basal epitelial em amostras de câncer comparadas com HSIL e controle, sugerindo que esta enzima possa ser um possível biomarcador para o CC invasivo (189). Em nosso estudo, embora a frequência de células expressando MMP-7 tenha sido muito baixa, essa frequência foi maior no estroma que no epitélio em pacientes com HSIL. Corroborando com nossos resultados, Guo e colaboradores (2018) (156) observaram alta expressão de MMP-7 em 28,9% das amostras de CC estudadas, sendo a expressão mais prevalente em células estromais, como fibroblastos e macrófagos. Diante dos achados da literatura e da expressão predominante destas MMPs no estroma do grupo HSIL neste trabalho, podemos ressaltar a importância das células estromais no desenvolvimento de lesões e progressão para o câncer cervical, uma vez que já foi descrito que as células tumorais induzem células vizinhas a produzirem MMPs, assim levando a degradação das barreiras físicas e químicas dos tecidos e invasão tumoral.

Dentre os moduladores, TIMP-2 foi observada ser muito pouco expressa no epitélio e com um leve aumento no estroma em ambos os grupos, porém, a expressão geral de TIMP-2 foi cinco vezes maior em HSIL do que em controle. Nossos resultados vão contra os achados da maioria dos estudos, onde é visto que a expressão de TIMP-2 é intensa na cérvix normal, sendo diminuída em NICs (179,181). Em carcinoma invasivo, as observações são conflitantes. Alguns estudos demonstraram baixos níveis de expressão de TIMP-2 em cânceres cervicais (143,179), contudo, Nair e colaboradores (2003) (190) observaram intensa expressão de TIMP-2 em 95% dos carcinomas invasivos. O desequilíbrio da razão entre MMP-2 e TIMP-2, levando ao

aumento em favor de MMP-2, é considerado um dos marcadores de progressão para doença invasiva (179). Além disso, foi visto que a metilação do gene de TIMP-2 é frequente em carcinoma e lesões em comparação com amostras normais, e é sugerido que a metilação inativa certas regiões do gene TIMP-2, reduzindo a expressão da proteína (158). Neste trabalho, encontramos uma expressão 32 vezes maior de MMP-2 em relação a TIMP-2 no grupo controle, e 21 vezes maior em relação ao grupo HSIL. A média de TIMP-2 em HSIL foi 5 vezes maior em relação ao grupo controle. Esse achado reforça a ideia de que TIMP-2 pode estar exercendo outras funções, que não a de inibição de MMPs. Contudo, isto é apenas uma especulação, uma vez que não fomos capazes de analisar amostras de LSIL e carcinoma. Além disso, outros estudos são necessários para confirmar o papel ativador para TIMP-2, como por exemplo, a avaliação da co-expressão com MT1-MMP (MMP-14), protease que faz parte do complexo de ativação de MMP-2.

Neste trabalho, não encontramos diferença na distribuição de células expressando EphA2 no epitélio entre os grupos. No entanto, encontramos uma alta expressão deste marcador no estroma, sendo significativamente maior no grupo HSIL em comparação com controle, com presença de positividade em células endoteliais. Nossos resultados corroboram, em parte, os achados de Li e colaboradores (2006) (170), que encontraram alta expressão de EphA2 em células de câncer ovariano e células endoteliais, e que tumores com alta expressão de EphA2 tiveram um aumento da densidade microvascular. Membros da família de receptores tirosina quinase estão intimamente ligados a processos como proliferação, diferenciação, migração e controle do ciclo celular (191). Diante disto, Yang e colaboradores (2009) (192) encontraram alta expressão de EphA2 em carcinoma hepatocelular, sendo este associado a marcadores de invasão (MMP-9) e angiogênese (CD34), sugerindo que elevados níveis de EphA2

podem promover a invasão e colonização tumoral através de mecanismos dependentes de MMP, porém, este mecanismo não está ainda elucidado. Esta associação com MMP também foi observada por Lin e colaboradores (2006) (170), que relataram que a expressão de EphA2 em componente celular endotelial está associado com expressão de MMP-9 epitelial. Em nosso estudo, não encontramos esta associação, contudo, observamos uma correlação positiva entre MMP-9 e EfrinaA1, ligante de EphA2. A expressão de EfrinaA1, apesar de ter sido bem menor em comparação com EphA2, foi maior no estroma do grupo HSIL em comparação com controle, porém, sem diferença estatística significativa. Na literatura, foi relatado que a ligação entre EphA2 e EfrinaA1 leva à autofosforilação do receptor, desencadeando a inibição de uma cascata de sinalização oncogênica, e a diminuição de EfrinaA1 leva ao aumento da expressão de EphA2 não fosforilada, favorecendo a oncogênese (164), o que justificaria nossos resultados. Contudo, alguns grupos relatam que a diminuição da ligação do receptor-ligante em células malignas, não se deve apenas à diminuição da expressão protéica de EfrinaA1 (193), e sim que possa haver uma interação anormal entre receptor e ligante no desenvolvimento do CC, porém, o mecanismo ainda permanece desconhecido (172).

Em estudo prévio, nosso grupo (73) observou um aumento na expressão de TNF- α em lesões de colo uterino de mulheres infectadas por HPV comparadas com aquelas co-infectadas pelo HIV-1. Essa redução pode ser explicada pelo fato das principais células infectadas por HIV-1, macrófagos e linfócitos TCD4⁺, serem células produtoras de TNF- α . Além disso, na infecção por HPV há a ativação de macrófagos endocervicais e, conseqüentemente, um aumento na expressão de TNF- α (79). No presente estudo, encontramos um leve aumento na expressão de TNF- α no estroma de mulheres do grupo HSIL em comparação ao grupo controle. Peghini e colaboradores observaram altos níveis de citocinas com perfil de Th2 em lesões de alto grau quando

comparada aos de baixo grau. Além disso, em pacientes com CC, houve aumento de Treg, sugerindo que a progressão tumoral é dependente de supressão da imunidade celular. Além disso, outros trabalhos observaram diminuição de TNF- α no soro de pacientes com carcinoma em relação em mulheres com NIC, sugerindo uma associação da diminuição desta citocina com a diminuição da resposta inflamatória e progressão para o câncer (70-72). Das e colaboradores (2018) (189), demonstraram níveis de TNF- α diminuídos tanto em proteína como em RNAm em casos de carcinoma cervical em relação a controle. O grupo observou uma correlação entre os níveis de IFN- γ no soro de pacientes com câncer cervical infectada por HPV com os níveis de TNF- α no soro, sendo este achado estando em acordo com o fato de a produção de TNF- α ser induzida por IFN- γ (190). Este achado sugere que a expressão protéica de TNF- α em pacientes com lesão, pode estar sendo regulada negativamente por outras citocinas e não necessariamente, ou diretamente, pela infecção por HPV.

Neste trabalho, não fomos capazes de avaliar a expressão destes marcadores com grau da lesão devido à dificuldade em incluir amostras de LSIL e câncer. Mais estudos são necessários para se estabelecer uma associação entre a expressão de MMPs e seus inibidores com a progressão para lesões mais graves e CC.

Ao analisarmos a expressão gênica de MMPs e seus moduladores em linhagens HeLa e C33A, sem estímulo por TNF- α , observamos um aumento da expressão do RNAm destes marcadores, exceto MMP-9 e EphA2, em HeLa quando relacionados com a expressão em C33A, sugerindo que a presença do HPV de alto risco possa estar influenciando na expressão destes marcadores. O mesmo padrão da MMPs foi observado por Cardeal e colaboradores (2006) (195), onde demonstraram alta expressão de MMP-2 e TIMP-2 e baixa expressão de MMP-9 em linhagens HPV positivas, quando comparadas com C33A. Em relação EphA2, nosso achado vai de encontro aos

dados da literatura, onde alguns demonstram que EphA2 é expresso de maneira endógena em células HeLa (192,193).

Uma vez que é conhecido que a expressão das MMPs é regulada pré e pós-transcricionalmente por citocinas e fatores de crescimento (122–124), poucos trabalhos avaliam a relação direta destes fatores na indução de MMPs juntamente com alguns de seus moduladores. O TNF- α , como já visto, é uma importante citocina pró-inflamatória e possui papel relevante no desenvolvimento de lesões de colo uterino e CC. Diante disto, buscamos avaliar se esta citocina é capaz de induzir a expressão gênica de algumas MMPs e seus moduladores nas linhagens analisadas. Assim, confirmamos que as linhagens HeLa e C33A, independentemente, são responsivas ao estímulo com TNF- α . A expressão de RNAm de TNF- α em HeLa foi 7,5 vezes mais alta que C33A quando estimuladas com 20ng/mL nas primeiras 6h de estímulo. No entanto, conforme o aumento do tempo de estímulo, houve uma diminuição dessa expressão, sugerindo que esta redução possa ser devido a ação tardia das oncoproteínas do HPV de alto risco, que são capazes de bloquear vias de sinalização de TNFR1 (83,84).

Não encontramos na literatura trabalhos que relatem a expressão de RNAm de MMPs e seus moduladores aqui estudados em linhagens cervicais, sob estímulo com TNF- α . No entanto, podemos destacar o importante papel das oncoproteínas do HPV na expressão destas MMPs, já que a HeLa é infectada pelo HPV18, que é considerado oncogênico. Tem sido descrito que as oncoproteínas E5, E6 e E7 dos HPVs de alto risco, podem desencadear vias de sinalização Akt, que ativa fatores de transcrição promovendo a expressão gênica de MMPs (154). Cardeal e colaboradores (2012) (150) demonstraram que estas oncoproteínas podem desestabilizar a interação das MMPs com seus reguladores, uma vez que, ao transfectar uma linhagem de queratinócito HFK com a oncoproteína E6 do HPV16, observaram uma maior expressão de pró-MMP-9 e que

E6E7 juntas, levavam a diminuição da regulação de TIMP-2 e RECK, tanto em nível de proteína, quanto em nível de RNAm. Kaewprag e colaboradores (2013) (151) demonstraram um aumento na expressão de MMP-2 e MT1-MMP em linhagem C33A transfectada com E6 e E7 do HPV16, e que estas oncoproteínas se ligam a duas regiões promotoras dos genes destas MMPs: *PEA3* (-553 a -540) e *Sp1* (-91) em MMP-2, e *PEA3* (-303) e *Sp1* (-102) em MT1-MMP, sugerindo que estas regiões são essenciais para a transativação e atividade destas MMPs. Zhu e colaboradores (2015) (152) relataram que o silenciamento de E6 e E7 em linhagem SiHa, levou a baixa regulação de RNAm de MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP, contudo, apenas MT1 apresentou diminuição em nível de proteína. Neste mesmo estudo, C33A transfectadas com E6 e E7 do HPV16, apresentaram maior regulação em nível de proteína destas MMPs (152). Além disso, a E6 do HPV18, foi vista ser capaz de regular miR-20b, aumentando sua transcrição em células de carcinoma cervical e levando a degradação de TIMP-2 e favorecendo a migração celular.

Com relação aos moduladores, apesar da observação da presença de metilação no gene de TIMP-2 em amostras teciduais de lesão e câncer cervical, levando a redução da expressão de proteína, como visto por Furtado e colaboradores (2015) (158), em linhagem celular, foi visto que os locais CpG dentro da região 1919-1987 (-325 a -257), relacionado ao local de início de transcrição do promotor, não regula a expressão do gene *TIMP-2* em Caski e HeLa (194). Como já discutido anteriormente, é conhecido que a oncoproteína E6 do HPV de alto risco, pode bloquear vias de sinalização apoptóticas do receptor de TNF- α , TNFR1, favorecendo a ativação celular. Contudo, em estudo *in vitro*, Gaiotti e colaboradores (2000) (195) demonstraram que TNF- α foi capaz de aumentar a transcrição do RNAm de anfiregulina, um receptor do fator de transcrição EGF, e este conseqüentemente levou ao aumento do RNAm das

oncoproteínas E6 e E7, do HPV de alto risco. Uma vez que as MMPs podem ser reguladas por fatores de crescimento e sua expressão ser induzida por vias de sinalização ativadas por E6 e E7, podemos sugerir que o aumento de expressão gênica das MMPs, pode ter sofrido a influência da estimulação desta citocina indiretamente sobre oncoproteínas do HPV de alto risco.

8. CONCLUSÕES

Este trabalho conclui, portanto, que as MMP-2, MMP-9 e o receptor EphA2 possuem papel no desenvolvimento de lesões de alto grau. Como discutido, o desenvolvimento de lesões e progressão do câncer é profundamente associado com a capacidade de células estromais produzirem MMPs induzidas pelas células tumorais. Um dado que corrobora com este achado é o maior número de células positivas para estes marcadores no estroma de amostras de colo uterino com HSIL, em comparação com amostras de colo uterino sem presença de lesão. Além disso, células endoteliais positivas para MMP-9 e EphA2 foram presentes em amostras HSIL e não em amostras sem lesão, destacando seus possíveis papéis na angiogênese e desenvolvimento da lesão. Os demais marcadores não possuem influência no desenvolvimento de lesões de alto grau.

No estudo *in vitro*, conclui-se que citocina TNF- α possui um papel modulador em relação a expressão de RNAm de todas as MMPs estudadas e moduladores, com exceção de EphA2, em linhagem de queratinócitos cervicais infectadas por HPV de alto risco; e que a infecção por HPV por si só, é capaz de induzir a expressão de RNAm das MMPs e moduladores (exceto EphA2), uma vez que amostras sem estímulo em HeLa apresentaram aumento nos níveis de RNAm destes marcadores.

9. PERSPECTIVAS

- Identificar a expressão proteica dos receptores de TNF- α , TNFR1 e TNFR2, nas amostras teciduais de mulheres com e sem lesão.
- Identificar a expressão gênica de *TNFR1* e *2* em linhagens cervicais.
- Avaliar a expressão destas MMPs e moduladores, e TNFR1 e 2, em linhagem cervical HPV16, SiHa
- Identificar a presença das oncoproteínas do HPV de alto risco nas linhagens cervicais

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Smith GD, Travis L. Getting to know human papillomavirus (HPV) and the HPV vaccines. *J Am Osteopath Assoc*. 2011 Mar;111(3 Suppl 2):S29-34.
2. Vu M, Yu J, Awolude OA, Chuang L. Cervical cancer worldwide. *Current Problems in Cancer* [Internet]. 2018 Jun 25 [cited 2018 Oct 31]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014702721830134X>
3. Stanley M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecol Oncol*. 2008 May;109(2 Suppl):S15-21.
4. Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Alberto G, Serrano B, Mena M, Gómez D, et al. Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 27. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre); 2017.
5. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007 Jul;7(7):453–9.
6. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*. 2010 Dec 15;202(12):1789–99.
7. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2012 Oct;136(10):1266–97.
8. Fernandes ATG, Rocha NP, Vendrame E, Russomano F, Grinsztejn BJ, Friedman RK, et al. Polymorphism in apoptotic BAX (-248G>A) gene but not in anti-apoptotic BCL2 (-938C>A) gene and its protein and mRNA expression are associated with cervical intraepithelial neoplasia. *Apoptosis*. 2015 Oct;20(10):1347–57.

9. Rocha NP, Avvad E, Russomano F, Roma EH, Pinto AC, Klumb EM, et al. TNFR1 single nucleotide polymorphisms are not associated with cervical HPV-induced pre-malignant lesion but regulate in situ cervical TNFR1 expression. 2018
- ;
10. Brummer O, Böhmer G, Hollwitz B, Flemming P, Petry K-U, Kühnle H. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation--an immunohistochemical study. *Gynecol Oncol*. 2002 Feb;84(2):222–7.
11. Beaudoux J-L, Giral P, Bruckert E, Foglietti M-J, Chapman MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med*. 2004 Feb;42(2):121–31.
12. Fernandes ATG, da Rocha NP, Avvad E, Grinsztejn BJ, Russomano F, Tristão A, et al. Balance of apoptotic and anti-apoptotic marker and perforin granule release in squamous intraepithelial lesions. HIV infection leads to a decrease in perforin degranulation. *Exp Mol Pathol*. 2013 Oct;95(2):166–73.
13. Rosa MI da, Medeiros LR, Rosa DD, Bozzeti MC, Silva FR, Silva BR. Human papillomavirus and cervical neoplasia. *Cadernos de Saúde Pública*. 2009 May;25(5):953–64.
14. Faridi R, Zahra A, Khan K, Idrees M. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virol J*. 2011 Jun 3;8:269.
15. McBride AA. Oncogenic human papillomaviruses. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci*. 2017 Oct 19;372(1732).
16. Meisels A, Fortin R, Roy M. Condylomatous lesions of the cervix. II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study. *Acta Cytol*. 1977 Jun;21(3):379–90.
17. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*. 2008 Aug 19;26 Suppl 10:K1-16.

18. Gravitt PE. The known unknowns of HPV natural history. *J Clin Invest.* 2011 Dec;121(12):4593–9.
19. Carter JR, Ding Z, Rose BR. HPV infection and cervical disease: a review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2011 Apr;51(2):103–8.
20. von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer.* 2002 Nov;38(17):2229–42.
21. Kurman RJ, Solomon D. *The Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic Diagnoses.* Springer; 1994.
22. Curado M., Edwards B, Shin HR, Ferlay J, Heanue M, Boyle P, et al. *Cancer Incidence in Five Continents, Volume IX. Vol. 160. IARC Scientific Publication; 2009.*
23. Schiller JT, Day PM, Kines RC. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol.* 2010 Jun;118(1 Suppl):S12-17.
24. Bhat P, Mattarollo SR, Gosmann C, Frazer IH, Leggatt GR. Regulation of immune responses to HPV infection and during HPV-directed immunotherapy. *Immunol Rev.* 2011 Jan;239(1):85–98.
25. Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol.* 2006 Apr;16(2):83–97.
26. Camara GNL, Cerqueira DM, Oliveira APG, Silva EO, Carvalho LGS, Martins CRF. Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003 Oct;98(7):879–83.
27. Mansur C. Molecular Mechanisms of HPV-induced Carcinogenesis. In: *Human papillomaviruses – clinical and scientific advances.* London: Arnold; 2001. p. 24–32.

28. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci*. 2006 May;110(5):525–41.
29. May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*. 1999 Dec 13;18(53):7621–36.
30. Bernard X, Robinson P, Nominé Y, Masson M, Charbonnier S, Ramirez-Ramos JR, et al. Proteasomal degradation of p53 by human papillomavirus E6 oncoprotein relies on the structural integrity of p53 core domain. *PLoS ONE*. 2011;6(10):e25981.
31. Soria C, Estermann FE, Espantman KC, O’Shea CC. Heterochromatin silencing of p53 target genes by a small viral protein. *Nature*. 2010 Aug 26;466(7310):1076–81.
32. Gagnon D, Joubert S, Sénéchal H, Fradet-Turcotte A, Torre S, Archambault J. Proteasomal degradation of the papillomavirus E2 protein is inhibited by overexpression of bromodomain-containing protein 4. *J Virol*. 2009 May;83(9):4127–39.
33. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2000 May 3;92(9):690–8.
34. Eck MJ, Sprang SR. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem*. 1989 Oct 15;264(29):17595–605.
35. Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev*. 1998 Jul 1;12(13):2061–72.
36. Barnard P, Payne E, McMillan NA. The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon-alpha. *Virology*. 2000 Nov 25;277(2):411–9.
37. Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O’Brien PM, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer*. 2005 Jan 10;113(2):276–83.

38. Khunamornpong S, Settakorn J, Sukpan K, Srisomboon J, Ruangvejvorachai P, Thorner PS, et al. Cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma of the uterine cervix is associated with lymph node metastasis. *Gynecol Oncol*. 2009 Jan;112(1):241–7.
39. zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Oct 9;1288(2):F55-78.
40. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006 Mar 30;24 Suppl 1:S1-15.
41. Ribeiro AA, Figueiredo Alves RR, Costa MC, Villa LL, Zeferino LC, Mauricette Derchain SF, et al. Association between HPV types and species groups and cervical neoplasia from a high-risk area for cervical cancer, Goiânia, Brazil. *Int J Gynecol Pathol*. 2011 May;30(3):288–94.
42. Roteli-Martins CM, de Carvalho NS, Naud P, Teixeira J, Borba P, Derchain S, et al. Prevalence of human papillomavirus infection and associated risk factors in young women in Brazil, Canada, and the United States: a multicenter cross-sectional study. *Int J Gynecol Pathol*. 2011 Mar;30(2):173–84.
43. Queiroz C, Travassos AG, Studart E, Araújo Filho JB, Sarno CK, Pinheiro CC. Prevalence of human Papilloma Virus in HIV-positive and HIV-negative patients in the State of Bahia: a pilot study. *Braz J Infect Dis*. 2004 Oct;8(5):356–62.
44. Associação Hospitalar Moinhos de Vento. Estudo Epidemiológico sobre a Prevalência Nacional de Infecção pelo HPV - POP Brasil: Resultados Preliminares. Porto Alegre; 2017. 120 p.
45. de Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer*. 2017 15;141(4):664–70.
46. INCA. Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil. In Rio de Janeiro; 2017.
47. Stewart B, Wild C. World Cancer Report: 2014. Lyon: IARC; 2014.

48. Qu Y, Zhao G, Li H. Forward and Reverse Signaling Mediated by Transmembrane Tumor Necrosis Factor-Alpha and TNF Receptor 2: Potential Roles in an Immunosuppressive Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 2017;8:1675.
49. Canault M, Peiretti F, Kopp F, Bonardo B, Bonzi M-F, Coudeyre J-C, et al. The TNF alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) is expressed in the atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice: possible contribution to elevated plasma levels of soluble TNF alpha receptors. *Atherosclerosis.* 2006 Jul;187(1):82–91.
50. Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003 Aug;14(3–4):185–91.
51. Wajant H, Scheurich P. TNFR1-induced activation of the classical NF- κ B pathway. *FEBS J.* 2011 Apr;278(6):862–76.
52. Kothari N, Bogra J, Abbas H, Kohli M, Malik A, Kothari D, et al. Tumor Necrosis Factor gene polymorphism results in high TNF level in sepsis and septic shock. *Cytokine.* 2013 Feb 1;61(2):676–81.
53. Szondy Z, Pallai A. Transmembrane TNF-alpha reverse signaling leading to TGF-beta production is selectively activated by TNF targeting molecules: Therapeutic implications. *Pharmacol Res.* 2017;115:124–32.
54. Moelants EAV, Mortier A, Van Damme J, Proost P. Regulation of TNF- α with a focus on rheumatoid arthritis. *Immunol Cell Biol.* 2013 Jul;91(6):393–401.
55. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford).* 2010 Jul;49(7):1215–28.
56. Vujanovic L, Szymkowski DE, Alber S, Watkins SC, Vujanovic NL, Butterfield LH. Virally infected and matured human dendritic cells activate natural killer cells via cooperative activity of plasma membrane-bound TNF and IL-15. *Blood.* 2010 Jul 29;116(4):575–83.

57. Zhang H, Yan D, Shi X, Liang H, Pang Y, Qin N, et al. Transmembrane TNF-alpha mediates "forward" and "reverse" signaling, inducing cell death or survival via the NF-kappaB pathway in Raji Burkitt lymphoma cells. *J Leukoc Biol.* 2008 Sep;84(3):789-97.
58. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002 Dec 19;420(6917):860-7.
59. Schetter AJ, Heegaard NHH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis.* 2010 Jan;31(1):37-49.
60. Patel SA, Heinrich AC, Reddy BY, Rameshwar P. Inflammatory mediators: Parallels between cancer biology and stem cell therapy. *J Inflamm Res.* 2009 Jan 1;2:13-9.
61. Nakagawa J, Saio M, Tamakawa N, Suwa T, Frey AB, Nonaka K, et al. TNF expressed by tumor-associated macrophages, but not microglia, can eliminate glioma. *Int J Oncol.* 2007 Apr;30(4):803-11.
62. Larmonier N, Cathelin D, Larmonier C, Nicolas A, Merino D, Janikashvili N, et al. The inhibition of TNF-alpha anti-tumoral properties by blocking antibodies promotes tumor growth in a rat model. *Exp Cell Res.* 2007 Jul 1;313(11):2345-55.
63. Ferrajoli A, Keating MJ, Manshoury T, Giles FJ, Dey A, Estrov Z, et al. The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002 Aug 15;100(4):1215-9.
64. Ahmed MI, Salahy EE, Fayed ST, El-Hefnawy NG, Khalifa A. Human papillomavirus infection among Egyptian females with cervical carcinoma: relationship to spontaneous apoptosis and TNF-alpha. *Clin Biochem.* 2001 Sep;34(6):491-8.
65. Michalaki V, Syrigos K, Charles P, Waxman J. Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer.* 2004 Jun 14;90(12):2312-6.

66. García-Tuñón I, Ricote M, Ruiz A, Fraile B, Paniagua R, Royuela M. Role of tumor necrosis factor-alpha and its receptors in human benign breast lesions and tumors (in situ and infiltrative). *Cancer Sci.* 2006 Oct;97(10):1044–9.
67. Tselepis C, Perry I, Dawson C, Hardy R, Darnton SJ, McConkey C, et al. Tumour necrosis factor-alpha in Barrett's oesophagus: a potential novel mechanism of action. *Oncogene.* 2002 Sep 5;21(39):6071–81.
68. Humblet C, Greimers R, Delvenne P, Deman J, Boniver J, Defresne MP. Prevention of murine radiogenic thymic lymphomas by tumor necrosis factor or by marrow grafting. *J Natl Cancer Inst.* 1996 Jun 19;88(12):824–31.
69. Leber TM, Balkwill FR. Regulation of monocyte MMP-9 production by TNF-alpha and a tumour-derived soluble factor (MMPSF). *Br J Cancer.* 1998 Sep;78(6):724–32.
70. Nabors LB, Suswam E, Huang Y, Yang X, Johnson MJ, King PH. Tumor necrosis factor alpha induces angiogenic factor up-regulation in malignant glioma cells: a role for RNA stabilization and HuR. *Cancer Res.* 2003 Jul 15;63(14):4181–7.
71. Scott M, Nakagawa M, Moscicki A-B. Cell-Mediated Immune Response to Human Papillomavirus Infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001 Mar;8(2):209–20.
72. Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J. Inflammatory response in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Pathol Res Pract.* 1997;193(7):491–5.
73. Boccardo E, Lepique AP, Villa LL. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2010 Nov;31(11):1905–12.
74. Kondo S, Sauder DN. Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1 (p55) is a main mediator for TNF-alpha-induced skin inflammation. *Eur J Immunol.* 1997 Jul;27(7):1713–8.

75. Ho GYF, Einstein MH, Romney SL, Kadish AS, Abadi M, Mikhail M, et al. Risk factors for persistent cervical intraepithelial neoplasia grades 1 and 2: managed by watchful waiting. *J Low Genit Tract Dis*. 2011 Oct;15(4):268–75.
76. Peghini BC, Abdalla DR, Barcelos ACM, Teodoro L das GVL, Murta EFC, Michelin MA. Local cytokine profiles of patients with cervical intraepithelial and invasive neoplasia. *Hum Immunol*. 2012 Sep;73(9):920–6.
77. El-Sherif AM, Seth R, Tighe PJ, Jenkins D. Quantitative analysis of IL-10 and IFN-gamma mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. *J Pathol*. 2001 Sep;195(2):179–85.
78. Lages EL e, Belo AV, Andrade SP, Rocha MÂ, Ferreira de Freitas G, Lamaita RM, et al. Analysis of systemic inflammatory response in the carcinogenic process of uterine cervical neoplasia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2011 Oct 1;65(7):496–9.
79. Nicol AF, Fernandes ATG, Grinsztejn B, Russomano F, E Silva JRL, Tristão A, et al. Distribution of immune cell subsets and cytokine-producing cells in the uterine cervix of human papillomavirus (HPV)-infected women: influence of HIV-1 coinfection. *Diagn Mol Pathol*. 2005 Mar;14(1):39–47.
80. Hagari Y, Budgeon LR, Pickel MD, Kreider JW. Association of tumor necrosis factor-alpha gene expression and apoptotic cell death with regression of Shope papillomas. *J Invest Dermatol*. 1995 Apr;104(4):526–9.
81. Villa LL, Vieira KB, Pei XF, Schlegel R. Differential effect of tumor necrosis factor on proliferation of primary human keratinocytes and cell lines containing human papillomavirus types 16 and 18. *Mol Carcinog*. 1992;6(1):5–9.
82. Termini L, Boccardo E, Esteves GH, Hirata R, Martins WK, Colo AEL, et al. Characterization of global transcription profile of normal and HPV-immortalized keratinocytes and their response to TNF treatment. *BMC Med Genomics*. 2008 Jun 27;1:29.
83. Tungteakkhun SS, Duerksen-Hughes PJ. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol*. 2008;153(3):397–408.

84. Lagunas-Martínez A, Madrid-Marina V, Gariglio P. Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan;1805(1):6–16.
85. Basile JR, Zacny V, Münger K. The cytokines tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and TNF-related apoptosis-inducing ligand differentially modulate proliferation and apoptotic pathways in human keratinocytes expressing the human papillomavirus-16 E7 oncoprotein. *J Biol Chem*. 2001 Jun 22;276(25):22522–8.
86. Thompson DA, Zacny V, Belinsky GS, Classon M, Jones DL, Schlegel R, et al. The HPV E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in normal human fibroblasts. *Oncogene*. 2001 Jun 21;20(28):3629–40.
87. Chen F, Zhuang X, Lin L, Yu P, Wang Y, Shi Y, et al. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med*. 2015 Mar 5;13:45.
88. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012 Mar 20;21(3):309–22.
89. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*. 2008 Oct 6;27(45):5904–12.
90. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
91. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*. 2012 Feb 20;196(4):395–406.
92. Sounni NE, Noel A. Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy. *Clin Chem*. 2013 Jan;59(1):85–93.
93. Ozbek S, Balasubramanian PG, Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP, Adams JC. The evolution of extracellular matrix. *Mol Biol Cell*. 2010 Dec;21(24):4300–5.

94. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell*. 2010 Jun 15;18(6):884–901.
95. Yu H, Mouw JK, Weaver VM. Forcing form and function: biomechanical regulation of tumor evolution. *Trends Cell Biol*. 2011 Jan;21(1):47–56.
96. Radisky ES, Radisky DC. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010 Jun;15(2):201–12.
97. Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016;31(sup1):177–83.
98. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 2006 Feb 15;69(3):562–73.
99. Overall CM. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol*. 2002 Sep;22(1):51–86.
100. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol*. 2003 Jul;200(4):448–64.
101. Pereira A, Carmo E, Silveira V, Amadei S, Rosa L. O papel da MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2006;52:257–62.
102. Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004 Aug;4(8):617–29.
103. Curry TE, Osteen KG. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev*. 2003 Aug;24(4):428–65.

104. McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C, Clark-Lewis I, et al. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem*. 2001 Nov 23;276(47):43503–8.
105. Rodríguez D, Morrison CJ, Overall CM. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan;1803(1):39–54.
106. Hrabec E, Naduk J, Streck M, Hrabec Z. [Type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) and their substrates--intracellular proteins, hormones, cytokines, chemokines and their receptors]. *Postepy Biochem*. 2007;53(1):37–45.
107. Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(6–7):1334–47.
108. Manicone AM, McGuire JK. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin Cell Dev Biol*. 2008 Feb;19(1):34–41.
109. Newby AC. Matrix metalloproteinase inhibition therapy for vascular diseases. *Vascul Pharmacol*. 2012 Jun;56(5–6):232–44.
110. Gomis-Rüth FX. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol Biotechnol*. 2003 Jun;24(2):157–202.
111. Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids*. 2011 Jul;41(2):271–90.
112. Nissinen L, Kähäri V-M. Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Aug;1840(8):2571–80.
113. Benbow U, Brinckerhoff CE. The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix Biol*. 1997 Mar;15(8–9):519–26.

114. Ala-aho R, Kähäri V-M. Collagenases in cancer. *Biochimie*. 2005 Apr;87(3–4):273–86.
115. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999 Jul 30;274(31):21491–4.
116. Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol*. 2007 Apr;211(1):19–26.
117. Fanjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S, López-Otín C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan;1803(1):3–19.
118. Roy S, Khanna S, Hussain S-RA, Biswas S, Azad A, Rink C, et al. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res*. 2009 Apr 1;82(1):21–9.
119. Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau CC, Burchard J, Linsley PS, et al. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol*. 2008 Sep;28(17):5369–80.
120. Chernov AV, Strongin AY. Epigenetic regulation of matrix metalloproteinases and their collagen substrates in cancer. *Biomol Concepts*. 2011 Jun;2(3):135–47.
121. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan;1803(1):55–71.
122. Ito I, Fixman ED, Asai K, Yoshida M, Gounni AS, Martin JG, et al. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta modulate the expression of matrix metalloproteinases and migratory function of human airway smooth muscle cells. *Clin Exp Allergy*. 2009 Sep;39(9):1370–80.

123. Park C-H, Chung JH. Epidermal growth factor-induced matrix metalloproteinase-1 expression is negatively regulated by p38 MAPK in human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2011 Nov;64(2):134–41.
124. Stetler-Stevenson WG. The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Cancer Metastasis Rev.* 2008 Mar;27(1):57–66.
125. Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trümper L, Balkwill FR, Binder C. Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis.* 2004 Aug;25(8):1543–9.
126. Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol.* 2015 Jul;44–46:247–54.
127. Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol.* 2011 Nov 11;12(11):233.
128. Yu WH, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner JF. TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):31226–32.
129. Wang T, Yamashita K, Iwata K, Hayakawa T. Both tissue inhibitors of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and TIMP-2 activate Ras but through different pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Aug 9;296(1):201–5.
130. Murphy AN, Unsworth EJ, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol.* 1993 Nov;157(2):351–8.
131. Qi JH, Ebrahim Q, Moore N, Murphy G, Claesson-Welsh L, Bond M, et al. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med.* 2003 Apr;9(4):407–15.

132. Celiker MY, Wang M, Atsidaftos E, Liu X, Liu YE, Jiang Y, et al. Inhibition of Wilms' tumor growth by intramuscular administration of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 plasmid DNA. *Oncogene*. 2001 Jul 19;20(32):4337–43.

133. Reunanen N, Kähäri V. Matrix Metalloproteinases in Cancer Cell Invasion [Internet]. Landes Bioscience; 2013 [cited 2018 Aug 30]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6598/>

134. Noël A, Jost M, Maquoi E. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. *Semin Cell Dev Biol*. 2008 Feb;19(1):52–60.

135. Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Ahmad R, Kaur G. Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(3):1085–91.

136. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J*. 2011 Jan;278(1):16–27.

137. Chen Q, Jin M, Yang F, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:928315.

138. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*. 2000 Jan 15;14(2):163–76.

139. Belotti D, Paganoni P, Manenti L, Garofalo A, Marchini S, Taraboletti G, et al. Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation. *Cancer Res*. 2003 Sep 1;63(17):5224–9.

140. van Hinsbergh VWM, Engelse MA, Quax PHA. Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Apr;26(4):716–28.

141. McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, Overall CM. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science*. 2000 Aug 18;289(5482):1202–6.
142. Godefroy E, Manches O, Dréno B, Hochman T, Rolnitzky L, Labarrière N, et al. Matrix metalloproteinase-2 conditions human dendritic cells to prime inflammatory T(H)2 cells via an IL-12- and OX40L-dependent pathway. *Cancer Cell*. 2011 Mar 8;19(3):333–46.
143. Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC, Lin RH. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res*. 2001 Jan 1;61(1):237–42.
144. Li T, Zhu Y, Han L, Ren W, Liu H, Qin C. VEGFR-1 activation-induced MMP-9-dependent invasion in hepatocellular carcinoma. *Future Oncol*. 2015;11(23):3143–57.
145. Shrestha B, Bajracharya D, Byatnal AA, Kamath A, Radhakrishnan R. May High MMP-2 and TIMP-2 Expressions Increase or Decrease the Aggressivity of Oral Cancer? *Pathol Oncol Res*. 2017 Jan;23(1):197–206.
146. Chang W-J, Du Y, Zhao X, Ma L-Y, Cao G-W. Inflammation-related factors predicting prognosis of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 Apr 28;20(16):4586–96.
147. Bottino J, Gelaleti GB, Maschio LB, Jardim-Perassi BV, de Campos Zuccari DAP. Immunoexpression of ROCK-1 and MMP-9 as prognostic markers in breast cancer. *Acta Histochem*. 2014 Oct;116(8):1367–73.
148. Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*. 1996 Mar 7;380(6569):79–82.
149. Pim D, Banks L. Loss of HPV-16 E7 dependence in cells transformed by HPV-16 E7 plus EJ-ras correlates with increased c-myc expression. *Oncogene*. 1991 Apr;6(4):589–94.
150. Cardeal LB da S, Boccardo E, Termini L, Rabachini T, Andreoli MA, di Loreto C, et al. HPV16 oncoproteins induce MMPs/RECK-TIMP-2 imbalance in primary keratinocytes: possible implications in cervical carcinogenesis. *PLoS ONE*. 2012;7(3):e33585.

151. Kaewprag J, Umnajvijit W, Ngamkham J, Ponglikitmongkol M. HPV16 oncoproteins promote cervical cancer invasiveness by upregulating specific matrix metalloproteinases. *PLoS ONE*. 2013;8(8):e71611.

152. Zhu D, Ye M, Zhang W. E6/E7 oncoproteins of high risk HPV-16 upregulate MT1-MMP, MMP-2 and MMP-9 and promote the migration of cervical cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(5):4981–9.

153. Pappa KI, Kontostathi G, Makridakis M, Lygirou V, Zoidakis J, Daskalakis G, et al. High Resolution Proteomic Analysis of the Cervical Cancer Cell Lines Secretome Documents Deregulation of Multiple Proteases. *Cancer Genomics Proteomics*. 2017 Dec;14(6):507–21.

154. Barillari G, Monini P, Sgadari C, Ensoli B. The Impact of Human Papilloma Viruses, Matrix Metallo-Proteinases and HIV Protease Inhibitors on the Onset and Progression of Uterine Cervix Epithelial Tumors: A Review of Preclinical and Clinical Studies. *Int J Mol Sci*. 2018 May 9;19(5).

155. Solov'eva NI, Timoshenko OS, Kugaevskaia EV, Andreeva II, Zavalishina LE. [Key enzymes of degradation and angiogenesis as a factors of tumor progression in squamous cell carcinoma of the cervix]. *Bioorg Khim*. 2014 Dec;40(6):743–51.

156. Guo H, Dai Y, Wang A, Wang C, Sun L, Wang Z. Association between expression of MMP-7 and MMP-9 and pelvic lymph node and para-aortic lymph node metastasis in early cervical cancer. *J Obstet Gynaecol Res*. 2018 Jul;44(7):1274–83.

157. Wu S-H, Zhang J, Li Y, Li J-M. [Expression of ETV5 and MMP-7 in early stage cervical squamous cell carcinoma and its role in lymphatic metastasis]. *Ai Zheng*. 2006 Mar;25(3):315–9.

158. Furtado Y, Almeida G, Silveira FA, Silva KS, Maldonado P, do Val IC, et al. TIMP-2 gene methylation in cervical precursor and invasive lesions. *Exp Mol Pathol*. 2015 Feb;98(1):119–23.

159. Biao-xue R, Xi-guang C, Shuan-ying Y, Wei L, Zong-juan M. EphA2-dependent molecular targeting therapy for malignant tumors. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011 Nov;11(9):1082–97.

160. Lindberg RA, Hunter T. cDNA cloning and characterization of eck, an epithelial cell receptor protein-tyrosine kinase in the eph/elk family of protein kinases. *Mol Cell Biol.* 1990 Dec;10(12):6316–24.

161. Holzman LB, Marks RM, Dixit VM. A novel immediate-early response gene of endothelium is induced by cytokines and encodes a secreted protein. *Mol Cell Biol.* 1990 Nov;10(11):5830–8.

162. Bartley TD, Hunt RW, Welcher AA, Boyle WJ, Parker VP, Lindberg RA, et al. B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine kinase. *Nature.* 1994 Apr 7;368(6471):558–60.

163. Héroult M, Schaffner F, Augustin HG. Eph receptor and ephrin ligand-mediated interactions during angiogenesis and tumor progression. *Exp Cell Res.* 2006 Mar 10;312(5):642–50.

164. Wykosky J, Palma E, Gibo DM, Ringler S, Turner CP, Debinski W. Soluble monomeric EphrinA1 is released from tumor cells and is a functional ligand for the EphA2 receptor. *Oncogene.* 2008 Dec 11;27(58):7260–73.

165. Iida H, Honda M, Kawai HF, Yamashita T, Shiota Y, Wang B-C, et al. Ephrin-A1 expression contributes to the malignant characteristics of α -fetoprotein producing hepatocellular carcinoma. *Gut.* 2005 Jun;54(6):843–51.

166. Potla L, Boghaert ER, Armellino D, Frost P, Damle NK. Reduced expression of EphrinA1 (EFNA1) inhibits three-dimensional growth of HT29 colon carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2002 Jan 25;175(2):187–95.

167. Koshikawa N, Hoshino D, Taniguchi H, Minegishi T, Tomari T, Nam S-O, et al. Proteolysis of EphA2 Converts It from a Tumor Suppressor to an Oncoprotein. *Cancer Res.* 2015 Aug 15;75(16):3327–39.

168. Sugiyama N, Gucciardo E, Tatti O, Varjosalo M, Hyytiäinen M, Gstaiger M, et al. EphA2 cleavage by MT1-MMP triggers single cancer cell invasion via homotypic cell repulsion. *J Cell Biol.* 2013 Apr 29;201(3):467–84.

169. Tatsukawa R, Koga K, Aoki M, Koshikawa N, Imafuku S, Nakayama J, et al. Immunohistochemical demonstration of EphA2 processing by MT1-MMP in invasive cutaneous squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*. 2016 Jul;469(1):25–34.

170. Lin YG, Han LY, Kamat AA, Merritt WM, Landen CN, Deavers MT, et al. EphA2 overexpression is associated with angiogenesis in ovarian cancer. *Cancer*. 2007 Jan 15;109(2):332–40.

171. Duxbury MS, Ito H, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE. Ligation of EphA2 by Ephrin A1-Fc inhibits pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Aug 6;320(4):1096–102.

172. Wu D, Suo Z, Kristensen GB, Li S, Troen G, Holm R, et al. Prognostic value of EphA2 and EphrinA-1 in squamous cell cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2004 Aug;94(2):312–9.

173. Holm R, de Putte GV, Suo Z, Lie AK, Kristensen GB. Expressions of EphA2 and EphrinA-1 in early squamous cell cervical carcinomas and their relation to prognosis. *Int J Med Sci*. 2008 Jun 5;5(3):121–6.

174. Stuelten CH, DaCosta Byfield S, Arany PR, Karpova TS, Stetler-Stevenson WG, Roberts AB. Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta. *J Cell Sci*. 2005 May 15;118(Pt 10):2143–53.

175. Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovsky T, Rath M, Niedzwiecki A. In vitro modulation of MMP-2 and MMP-9 in human cervical and ovarian cancer cell lines by cytokines, inducers and inhibitors. *Oncol Rep*. 2010 Mar;23(3):605–14.

176. Lee S-J, Park S-S, Cho Y-H, Park K, Kim E-J, Jung K-H, et al. Activation of matrix metalloproteinase-9 by TNF-alpha in human urinary bladder cancer HT1376 cells: the role of MAP kinase signaling pathways. *Oncol Rep*. 2008 Apr;19(4):1007–13.

177. Weiler J, Mohr M, Zänker KS, Dittmar T. Matrix metalloproteinase-9 (MMP9) is involved in the TNF- α -induced fusion of human M13SV1-Cre breast epithelial cells and human MDA-MB-435-pFDR1 cancer cells. *Cell Commun Signal*. 2018 Apr 10;16(1):14.

178. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010 Apr 2;141(1):52–67.
179. Branca M, Ciotti M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Costa S, et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its tissue inhibitor (TIMP-2) are prognostic factors in cervical cancer, related to invasive disease but not to high-risk human papillomavirus (HPV) or virus persistence after treatment of CIN. *Anticancer Res*. 2006 Apr;26(2B):1543–56.
180. Gaiotto MAM, Focchi J, Ribalta JLC, Stávale JN, Baracat EC, Lima GR, et al. Comparative study of MMP-2 (matrix metalloproteinase 2) immune expression in normal uterine cervix, intraepithelial neoplasias, and squamous cells cervical carcinoma. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 May;190(5):1278–82.
181. El-Sayed M. Changes in matrix metalloproteinase-2 expression and its endogenous tissue inhibitor TIMP-2 in normal, dysplastic, and neoplastic lesions of the uterine cervix. *Egyptian Journal of Pathology*. 2013 Dec;33(2):214.
182. Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J, Lerner-Geva L, Gotlieb WH, Weis B, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 in squamous cell carcinoma of the uterine cervix-clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization. *Gynecol Oncol*. 1999 Mar;72(3):380–6.
183. Talvensaaari-Mattila A, Pääkkö P, Höyhtyä M, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. *Cancer*. 1998 Sep 15;83(6):1153–62.
184. Sun J. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases Are Essential for the Inflammatory Response in Cancer Cells [Internet]. *Journal of Signal Transduction*. 2010 [cited 2018 Sep 2]. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jst/2010/985132/>
185. Westermarck J, Kähäri VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J*. 1999 May;13(8):781–92.

186. Coronato S, Laguens G, Girolamo V. rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. 72:495–502.
187. Westin MC, Rabelo-Santos SH, Ângelo-Andrade LA, Derchain S, Pinto GA, Morais SS, et al. Expression of MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2 in Intraepithelial and Invasive Cervical Neoplasia. *Journal of Cytology & Histology* [Internet]. 2015 Oct 21 [cited 2018 Sep 2];0. Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/expression-of-mmp2-mmp9-mmp14-timp1-timp2-in-intraepithelialand-invasive-cervical-neoplasia-2157-7099-S3-019.php?aid=64543>
188. Matheus ER, Zonta MA, Discacciati MG, Paruci P, Velame F, Cardeal LBS, et al. MMP-9 expression increases according to the grade of squamous intraepithelial lesion in cervical smears. *Diagn Cytopathol*. 2014 Oct;42(10):827–33.
189. Mysona D, Pyrzak A, Allen J, Bai S, Sharma A, She J-X, et al. MMP-7 a potential biomarker of invasive cervix cancer: A prospective pilot study. *JCO*. 2016 May 20;34(15_suppl):e17005–e17005.
190. Asha Nair S, Karunagaran D, Nair MB, Sudhakaran PR. Changes in matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during tumor progression in the uterine cervix. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003 Feb 1;129(2):123–31.
191. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57–70.
192. Yang P, Yuan W, He J, Wang J, Yu L, Jin X, et al. Overexpression of EphA2, MMP-9, and MVD-CD34 in hepatocellular carcinoma: Implications for tumor progression and prognosis. *Hepatol Res*. 2009 Dec;39(12):1169–77.
193. Easty DJ, Hill SP, Hsu MY, Fallowfield ME, Florenes VA, Herlyn M, et al. Up-regulation of ephrin-A1 during melanoma progression. *Int J Cancer*. 1999 Oct 22;84(5):494–501.
194. Nicol AF, Nuovo GJ, Wang Y, Grinsztejn B, Tristão A, Russomano F, et al. In situ detection of SOCS and cytokine expression in the uterine cervix from HIV/HPV coinfecting women. *Exp Mol Pathol*. 2006 Aug;81(1):42–7.

195. da Silva Cardeal LB, Brohem CA, Corrêa TCS, Winnischofer SMB, Nakano F, Boccardo E, et al. Higher expression and activity of metalloproteinases in human cervical carcinoma cell lines is associated with HPV presence. *Biochem Cell Biol.* 2006 Oct;84(5):713–9.

11- ANEXOS

11.1 Manuscrito submetido à revista *Oncotarget*

Objetivando identificar possíveis biomarcadores para progressão de lesões pré-malignas causadas por uma infecção por HPV, procuramos neste artigo, investigar polimorfismos em duas posições do gene do receptor de TNF- α , TNFR1 (rs767455 e rs2234649), e a expressão protéica deste receptor em amostras de lesões cervicais, para identificar seu papel no desenvolvimento da lesão cervical pré-maligna.

***TNFR1* single nucleotide polymorphisms are not associated with cervical HPV-induced pre-malignant lesion but regulate *in situ* cervical *TNFR1* expression**

Natália Pereira da Rocha¹, Elyzabeth Avvad-Portari², Fábio Russomano³, Eric Henrique Roma¹, Amanda Chaves Pinto⁴, Evandro Klumb⁵, Jacyara Macedo⁴, Ana Teresa Gomes Fernandes¹, Maria da Glória Bonecini-Almeida^{1*}

¹Laboratory of Immunology and Immunogenetics in Infectious Diseases, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

²Department of Pathologic Anatomy, Fernandes Figueira Woman, Child and Adolescent National Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

³Women's Health Care Area, Fernandes Figueira Woman, Child and Adolescent National Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Department of Biochemistry, State University of Rio de Janeiro - UERJ, Rio de Janeiro, Brazil

⁵Department of Rheumatology, State University of Rio de Janeiro - UERJ, Rio de Janeiro, Brazil

*To whom correspondence should be addressed: Maria da Glória Bonecini-Almeida, PhD, Laboratory of Immunology and Immunogenetics in Infectious Diseases, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation.

Avenida Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Zip code: 21040-900

Tel: +55 21 38659531

E-mail: gloria.bonecini@ini.fiocruz.br

Abstract

TNF- α , a pro-inflammatory cytokine, is involved in control of HPV infection by triggering cell signaling through binding in specific receptors TNFR1 and TNFR2. Genetic polymorphisms in these receptors may influence TNF- α signaling. In this work we investigated both the *TNFR1* rs767455 and rs2234649 single nucleotide polymorphism and the TNFR1 protein expression in cervical squamous intraepithelial lesions (SIL) to identify their role in cervical pre-malignant development. SIL patients (n=179) and healthy volunteers (n=227) were consecutively enrolled for *TNFR1* genotype analysis by PCR-RFLP assay in blood samples and to evaluate TNFR1 protein expression in cervical tissue by immunohistochemistry assay. No statistical differences in the genotypes and allelic frequencies for both polymorphisms were observed among groups, independent of the genetic model used. Cervical *in situ* TNFR1-expressing cells were rare in epithelium and in the basal layer of epithelium regardless the groups. However a progressive increase in infiltration cells was observed in the stroma area mainly in HSIL group when compared with LSIL (p<0.001) and control (p<0.001) groups. TNFR1-expressing cells frequency was higher in *TNFR1* rs767455AG/GG (p<0.001), and in rs2234649AA (p<0.001) genotypes carriers, mainly in HSIL subgroup. These data indicated that TNFR1-expression is abrogated in cervical epithelium where HPV-induced pre-malignant cervical lesion occurs, increasing its frequency in inflammatory cells in stroma, and is genetically controlled by *TNFR1* rs767455AG/GG and rs2234649AA genotypes. These biomarkers may be useful to identify cervical precancerous lesions progression.

Keywords: HPV, cervical lesions, *in situ* TNFR1 and *TNFR1* SNPs

INTRODUCTION

Cervical cancer is the second most common cancer among women around the world, and human papilloma virus (HPV) infection is the primary cause of this disease. HPV prevalence has steadily increased in the last decades, and became one of the most prevalent sexually transmitted infection in the world, with high prevalence in Africa (21.4%), Western Europe (21.45%) and Latin America (16.1%)[1–3]. In Brazil, the general prevalence ranged from 10.4 to 24.5% [4], although, a recent surveillance conducted by Brazilian Ministry of Health showed that 53,6% of young person from 16 to 26 years old were infected and 35,2% had high risk HPV-infection [5].

Cervical HPV infection is characterized by a chronic inflammation that induces intense immunological mechanisms including phagocytosis and cellular immunity, also triggering the production of many pro-inflammatory cytokines by infiltrating lymphocytes, macrophages and infected keratinocytes [6]. Previous results from our group described the presence of lymphocytic infiltrate and IL-6, IFN- γ and TNF- α expressing cells in cervical lesions[7].

TNF- α is one of the main mediators of inflammation in the skin and mucosae. When produced by tumor and inflammatory cells in the tumor microenvironment can promote the survival of malignant cells by inducing genes encoding anti-apoptotic molecules in a NF- κ B-dependent manner [8]. This cytokine is also able to stimulate the production of genotoxic molecules, such as nitric oxide and reactive oxygen species that cause DNA damage and mutations, and thus contribute to tumor initiation, progression, angiogenesis and metastasis [9]. TNF- α is involved either directly or indirectly in control of HPV infection. TNF- α is constitutively produced in HPV-harboring cervical keratinocytes [10] and in cervical lesions, where TNF- α was found mainly in a macrophage-like cells in stroma [7]. In fact, it was seen that HPV16-positive cervical

cell lines have increased levels of TNF- α mRNA compared with HPV-negative [11]. E6 protein from high-risk HPV16 mediates p53 degradation and induces cell transformation. Transfection of HPV16 E6 into TNF-sensitive LM cell line (a mouse fibroblast) protects expressing cells from TNF-induced apoptosis in a p53 independent manner [12]. HPV16 E6 oncoprotein binds directly to TNFR1, requiring the same C-terminal portion of TNFR1 as does TNFR1 associated death domain (TRADD) and E6 decreases TNFR1/TRADD association [13]. On the other hand, while E7 does not subvert signaling by TNFR1, pro-caspase 8 activation is decreased in E7- expressing fibroblast. E7 also provides some protection from apoptosis caused by stimulation of the TNFR1- related cytokine receptor Fas, where induction of apoptosis occurs much slower in this cell type [14]. Recent data demonstrated that TNF- α was downregulated at both mRNA and protein levels in cervical cancer and in CIN cases compared to controls. Moreover, TNF- α expression was correlated with insufficient modulation of IFN- γ and inversely correlated with HPV16 E6 and E7 transcripts in cervical cancer cases [15].

TNF- α exerts its biological activity at the cellular level, through its binding with the transmembrane receptors, TNFR1 [55kDa] and TNFR2 [75kDa]. Both are single transmembrane glycoproteins which can induce cell apoptosis or cell survival; however, the majority of signals are transmitted by TNFR1. TNFR1 is expressed almost in all cell types and has pleiotropic effects, acting on both NF- κ B activation, and apoptosis induction. This receptor is the main mediator of TNF signaling pathways, affecting binding of TNF- α in the membrane [16]. A growing number of genetic studies have identified several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *TNFR1A* gene as susceptibility or predictive markers of multifactorial inflammatory disorders [17–21] and cancer [22–27]. One of the functional consequences of these variants could be

linked to regulation of gene expression [28]. However, to our knowledge, there are no published studies regarding the relationship between SNPs in the *TNFR1A* gene, the *in situ* protein expression and the relationship with the maintenance of cervical lesion induced by HPV-infection among Brazilian population. In this study, we selected two SNPs (*TNFR1* rs767455 (+36A/G) and *TNFR1* rs2234649 (-383A/C) and determined their genotypes in a relatively large sample size. We then examined the correlation of these SNPs with the risk for cervical lesion development and the effect of observed variations in association with risk factors and TNFR1 expressing cells.

Results

Characteristics of studied population

A total of 406 women were enrolled for the genotyping study from clinical sites. From those, 179 SIL patients, classified as either LSIL (n=78) or HSIL (n=101), and 227 volunteers showing no lesions upon gynecological evaluation were enrolled. Table 1 describes clinical and behavior data on each studied group. Social and environmental data from SIL and control groups were identified such as age (37.70 ± 10.75 and 34.78 ± 10.62 years old, respectively), self-determined ethnicity, tobacco use, age at first sexual intercourse, menarche and number of pregnancies. No significant difference was found between SIL and control group in all co-variables describes, except age ($p < 0.01$) and age at first sexual intercourse ($p < 0.001$). Volunteers from control group were younger than SIL patient and HSIL subgroup ($p < 0.01$). Interestingly, patients with HSIL were more likely to use tobacco and had first sexual intercourse earlier when compared to control group, $p = 0.015$ and $p < 0.001$, respectively. In the LSIL and HSIL subgroups, the average age was 35.95 ± 10.72 and 39.05 ± 10.63 years old, respectively, and co-variables were not significantly different in both subgroups (data not shown).

***TNFR1 rs767455A>G* and *TNFR1 rs2234649A>C* gene frequency and their associations with cervical lesions**

The genotypes and alleles distribution of *TNFR1 rs767455* and *rs2234649* in SIL patients and control group are summarized in Table 2. The observed genotype frequencies of these SNPs agreed with Hardy-Weinberg equilibrium either in the case and control groups in *rs767455* ($p=0.5$ and 0.2 , respectively) and *rs2234649* ($p=0.1$ and 0.06 , respectively). No associations in genotype and allelic frequencies of *TNFR1 rs767455* and *TNFR1 rs2234649* polymorphisms were observed between SIL and control groups (Table 2), even when the SIL group was stratified into LSIL and HSIL subgroups (Table 3). No association was identified between LSIL and HSIL subgroups ($p>0.05$), in any genetic model tested (data not shown). There was no significant overall difference when the OR was adjusted for univariate model including age, ethnicity, tobacco use, age at first sexual intercourse, menarche, and number of pregnancies or in multivariate analysis (data not shown). These variables did not change the risk for SIL development. These results demonstrated no association with *TNFR1 rs767455* and *rs2234649* polymorphisms in cervical lesion progression induced by HPV-infection, in any genetic model tested.

TNFR1 rs767455 A>G and *TNFR1 rs2234649 A>C* had similar haplotype distribution in cervical lesions. The haplotypes *rs767455A/rs2234649A* and *rs767455G/rs2234649A* were more frequently observed in both groups. We observed a moderate LD between *rs767455* and *rs2234649* in SIL patients ($D'=0.489$, $p=0.007$) and in control ($D'=0.521$, $p=0.0031$) group.

TNFR1 expressing cells in cervical lesions

Recent data has pointed to the role of intra-tumor inflammatory cells. To evaluate the TNFR1 protein expression and its *in situ* cervical localization, we selected one-hundred and three samples from 25 healthy control, 38 LSIL and 40 HSIL volunteers. TNFR1-expressing cells were barely expressed in keratinocytes and inflammatory cells in the epithelium and in the basal layer of epithelium in all groups. However, a gradated increase in TNFR1-expressing cell with inflammatory cells morphology was observed in the stroma area in all SIL, mainly in HSIL group when compared with LSIL (1.9-fold, $p < 0.001$) and control groups (2.6-fold, $p < 0.001$). In perivascular area, there was a significant increase in TNFR1 expressing cells in the HSIL group when compared with control group ($p < 0.05$) (Figure 1). These results may indicate an enhancement of inflammatory cells frequency as a response to cervical lesions severity to attempt to prevent cancer cell invasion. As patients with HSIL were more likely to use tobacco we tested whether TNFR1 expression was related to this social condition. Our results showed no association between tobacco users and the frequency of cervical TNFR1-expression (data not shown).

Association of TNFR1 expression and *TNFR1 rs767455A>G* and *TNFR1 rs2234649A>C* SNPs in cervical lesions

Analyses were performed to evaluate the association between the *TNFR1 rs767455* and *rs2234649* polymorphisms with cervical TNFR1 protein expression. As *TNFR1 rs767455GG* and *TNFR1 rs2234649 CC* genotypes showed low frequency in our population, for further analysis the *rs767455AG* and *GG* genotypes and *rs2234649AC* and *CC* were combined. TNFR1-expressing cells were not influenced by *TNFR1 rs767455A>G* and *TNFR1 rs2234649A>C* genotypes in epithelium, basal layer of

epithelium and perivascular area (<1 cell/mm²), in all studied groups, as shown in Figure 2A and 2B. However, in stroma area, TNFR1 rs767455AA genotype carriers presented lower distribution of TNFR1-expressing cells when compared with TNFR1 rs767455AG/GG in HSIL group ($p<0.001$). Interestingly, the TNFR1-expressing cells were higher in TNFR1 rs767455A>A genotype only in LSIL group ($p<0.01$). Intergroup analysis showed no increased TNFR1 expression in *TNFR1 rs767455AA* carriers in HSIL (2.6-fold, $p<0.001$) and LSIL (2.2-fold, $p<0.001$) patients compared with control group. In *TNFR1rs767455AG/GG* carriers, TNFR1-expressing cells were 2.8 fold higher in HSIL subgroup when compared with control group ($p<0.001$) and 2.7 fold higher when compared with LSIL group ($p<0.001$). No significant difference was found between LSIL and control subgroups (Figure 2A).

The *TNFR1 rs2234649A>C* did not influence the distribution of TNFR1-expressing cervical cells in control group. However, when *TNFR1 rs2234649AA* genotype was compared with *rs2234649 AC/CC* genotypes there was a predominant TNFR1-expressing cell in *rs2234649AA* carriers in HSIL ($p=0.001$) and *AC/CC* genotypes in LSIL ($p<0.001$) group. In intergroup analysis, *TNFR1 rs2234649AA* homozygote carriers showed increased TNFR1-expressing inflammatory cells in HSIL when compared to control (3.1-fold, $p<0.001$), and LSIL groups (2.5-fold, $p<0.001$). No significant difference was found between LSIL and control groups. When TNFR1 *rs2234649 AC/CC* genotypes were compared, no increase in TNFR1-expressing cells was 1.6 fold higher in LSIL group compared with control group ($p<0.001$); 2.1-fold higher in HSIL compared with control group ($p<0.001$) and 1.3-fold higher when compared LSIL ($p<0.05$) (Figure 2B).

These data indicate that pre-malignant lesions induce an inflammatory process with increasing TNFR1-expressing cells distribution. Besides, *TNFR1 rs767455* AG/GG and *TNFR1 rs2234649* AA genotypes, might be associated with the development of high grade cervical lesions.

Discussion

Cervical cancer is one of the most common gynecological malignancies in Brazilian population and more than 50% of young adults are infected. Most of cervical lesions regress spontaneously, indicating that only HPV infection is not sufficient for inducing carcinogenesis. Other factors are necessary for inducing carcinogenic process, such as environmental, behavioral and genetic factors. This study investigated the *TNFR1 rs767455 A>G* and *TNFR1 rs2234649 A>C* SNPs in SIL development risk.

Analyses of behavioral data showed higher mean in age in SIL, especially in HSIL group, when compared with control group. It has been described that older women may develop more severe cervical lesions. POP-Brasil surveillance reported a higher HPV-DNA persistence in Brazilian women aged 16-26 years, enhancing the probability to high-grade lesions progression [5][preliminary results available at <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42003-estudo-apresenta-dados-nacionais-de-prevalencia-da-infeccao-pelo-hpv>]. The same observation was described in Japanese [29]women. HPV can be transmitted in first sexual intercourse before 20 years old, persisting between 25-30 years, reaching a peak after 55 years old [30]. In addition, the majority of HPV infections are transient, cofactors may affect the risk of lesions development and persistence, and it could be related to women age and behavior [31].

We observed that tobacco use has been associated with increased risk of high-grade lesions. The nicotine and its metabolite, cotinine, were found increased 4-fold in cervical mucus from women healthy smokers and 40-fold in women with SIL[32]. However, repair defects related to carcinogenesis and DNA damage were observed in smoker's cervical tissues. Benzo[a]pyrene (BaP), identified as prime carcinogen in cigarette smoke, was detected in cervical tissue, and DNA adducts were present in smokers twice as often as in noncurrent smokers [33]. Besides, nicotine and cotinine were associated with Langerhans cells reduction in uterine cervix from smokers, especially in HSIL women [34]. It has been suggested that the reduction of the antigen presenting cells population would be a responsible factor for the decrease in local immune response and SIL development [35]. Besides the high frequency of smokers in SIL patients the TNFR1 expression in cervical lesion was not different from those non-smokers, indicating that TNFR1 expression is not influenced by nicotine itself.

In the present study, no association was found between *TNFR1 rs2234649* and *rs767455* SNPs with SIL in any genetic models tested. To our knowledge, there are no reports evaluating the *TNFR1* polymorphisms in cervical cancer and/or HPV-related cervical lesions.

In relation to other cancers types, few descriptions were described with *TNFR1 rs2234649* or *rs767455* SNPs. No association was found for *TNFR1 rs2234649* in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma [23] and in myelopathy associated to HTLV-1 infection [36]. However, controversial results were found in *TNFR1 rs767455* SNPs, where no association was described in esophageal squamous cell carcinoma [22] and with a significant increased risk for breast cancer [37,38] and in odontogenic keratocystic tumor [39]. Moreover, other *TNFR1 SNP*s have been described in different types of cancer. *TNFR1 rs4149570 G>T* SNPs have been associated with

loss of heterozygosity in hepatocellular carcinoma, indicating that this SNP is susceptible to cancer genetic alterations [24]. In non-small cell lung cancer, this SNP had being associated with poor survival in patients under these conditions [25]. Wu et al.[2011] observed that patients carrying the wild-type allele G of *rs4149579 G/T* SNP had reduced risk for gastroesophageal reflux disease, which is a risk factor for esophageal adenocarcinoma[26]. In oral carcinoma, TT genotype of this SNP conferred a protective character on the cancer development [27].

We further evaluated the distribution of TNFR1-expressing cells in SIL and its association with cervical lesion development. We observed a rare cell distribution (<1.0 cells / mm²) in epithelium and in the basal layer of the epithelium in all groups. However, our study has shown a progressive increase of TNFR1-expressing inflammatory cells distribution nearby the lesion, in the stroma area according with lesion severity. It is noteworthy that our study is the first to correlate the distribution of TNFR1-expressing cells in HPV-associated cervical lesions and its progression to pre-malignant lesions.

TNFR1 protein expression, in its monomeric form, is constitutively expressed in all human tissues and appears to be altered by cytokines, especially in the epidermis [40]. The molecule trimerization leads to activation and binding in soluble TNF- α . TNFR1 expression has been observed in granulocytes, but is weakly expressed in lamina propria lymphocytes in patients with Crohn's Disease, regardless patients or healthy individuals [41]. In epithelial ovarian cancer, the TNFR1 expression was observed in the epithelial cell cytoplasm in both cancer and benign ovarian lesions, showing no association with the onset, progression or stage of disease [42]. A study conducted in China by Ma et al. evaluated both TNFR1 and TNFR2 receptors in hypopharyngeal squamous cell carcinoma (HPSCC). They observed expression of these

receptors in all specimens of HPSCC. However, when performed a ratio analysis of the two receptors expression, it was observed that TNFR2 expression is negatively correlated to TNFR1 expression, suggesting that the TNFR1 can dominate the interactions between the two receptors and, therefore, the clinical HPSCC outcome [43].

HPV infection can influence apoptotic signals transduction generated by TNF- α interaction with its receptor. Filippova et al. (2002) observed that HPV16-E6 oncoprotein does not interfere with protein expression, but inhibits the TNFR1 and TRADD interaction [13]. Likewise, E6 oncoprotein binds to the TNFR1 receptor, interfering with the TNF α -induced pro-apoptotic signaling, suggesting subsequent interactions impairment in death-inducing signaling complex (DISC) through caspase cascade activation, such as caspase-8 [44].

In our previous work, we demonstrated the expression of TNF- α and higher inflammatory cells distribution, both CD4⁺ and CD8⁺ cells T cells, in the uterine cervix increasing according to the lesion severity [7]. Similarly, Alves et al. (2010) observed an increased CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes number in HSIL and cervical carcinoma [45]. There are few reports in the literature addressing TNFR1 expression in CD4⁺ T cells in cervical pre-malignant lesions or associated with carcinogenesis. However, the involvement of CD4⁺ T cells and its relationship with TNFR1 have been demonstrated in other chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis [46]. The cellular migration can be related to the TNFR1 expression, since this receptor is expressed on a fraction of CD4⁺ T in RA patients but not in control group; this migration is dependent on the TNF- α concentration gradient *ex vivo*, and blocking of TNF- α or TNFR1 expression resulted in abrogation of CD4⁺ T cells migration in synovial tissue[46]. TNF- α markedly promotes tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis through TNF- α -TNFR1 signaling pathway, activating inflammatory macrophages and tumour-

associated macrophages (TAMs) to produce high levels of VEGF-C TNFR1 mediates TNF- α -induced tumor lymphangiogenesis and metastasis by modulating VEGF-C-VEGFR3 signaling[47].

The TNFR1 expressing cells in cervical stroma in SIL patients were composed primarily of mononuclear cells, including mainly macrophages and lymphocytes and rarely Langerhans cells and monocytes, as part of inflammatory cells pool expressing TNFR1. In our previous study, we demonstrated that rare monocytes were present in cervical lesions[7], but it may be associated with intra-tumoral macrophages origin and activation. Further studies may address the role of TNFRs regarding cell migration, activation and their apoptotic functions in cervical cancer.

We further evaluated the possible correlation between *TNFR1* polymorphisms and expression in SIL patients. Regarding the *rs767455A>G*, TNFR1-expressing cells distribution was higher in *AG/GG* carriers, while in *rs2234649A>C*, the distribution was greater in women carrying in the *AA* genotype. There are no reports in the literature associating *in situ* TNFR1 expression and its SNPs in the uterine cervix and thus, we should infer that the TNFR1 expression can be negatively modulated by HPV infection and TNFR1 biomarkers are discriminatory between normal and SIL cervix and may be used as an indicator for the cervical precancerous lesions progression.

MATERIAL AND METHODS

Study subjects and tissue samples

Four hundred and six non pregnant HIV-1 seronegative women were enrolled in this study from November, 2008 to October, 2010, aged 18 years older. Patients were

included at Fernandes Figueira Woman, Child, and Adolescent National Institute of Oswaldo Cruz Foundation (IFF/Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil and submitted to agynecological exam with colposcopy by certified gynecologist. According with histopathological analysis at the baseline gynecological visit, two groups were defined as having low (LSIL) and high (HSIL) grade squamous intraepithelial lesion (SIL). Patients received free appropriated treatment [48]. Healthy control group (n=227) with no proven cervical lesions and who were genetically unrelated to the SIL cases were recruited from three Clinical sites in Rio de Janeiro, RJ, Brazil: INI/Fiocruz, Pedro Ernesto University Hospital (HUPE-UERJ) and the Américo Piquet Carneiro Polyclinic at State University of Rio de Janeiro (UERJ). In a previous work, samples of the case group showed high positivity for the HPV pool (HPV 1, 6, 11, 16, 18 and 31) (96.3%) and HPV 16 (77.5%) immunostaining [49]. The control group was previously selected [50] who attended the Pedro Ernesto University Hospital (HUPE-UERJ) and the Américo Piquet Carneiro Polyclinic to get routine pelvic exam and Pap smear test, with normal cytology results. Women taking immunosuppressants, suffering from autoimmune diseases or cancer, hysterectomized, virgin, and those who did not tolerate the gynecological exam were excluded from this study. In the control group, women with a history of cervical injury were also excluded. Each participant answered questions regarding classic risk factors for cervical cancer and sociodemographic characteristics, including skin color/ethnicity, and signed an informed consent form. A standardized questionnaire including social and demographic data was applied. Written consent was obtained from all volunteers and the protocol approved by the Institutional Ethical Review Board from INI/Fiocruz, IFF/Fiocruz and UERJ with the number 0001.0.009.000-05.

Histopathologic examination

Paraffin-embedded cervical tissues were processed by conventional histopathology and routinely stained with hematoxylin-eosin (HE). Premalignant cervical lesions were classified as LSIL and HSIL, characterized by the stage of epithelial differentiation and maturation by a certified pathologist. The control group was composed of cervical biopsies from hysterectomized women, without HPV-related lesions.

DNA extraction and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism [PCR-RFLP] analysis

The genomic DNA extraction was performed soon after collection or kept at -20°C until DNA extraction of 5 ml of blood in EDTA tube using the commercial kit from Qiagen® [Hilden, Germany] following the manufacturer's protocol or using -20°C until DNA extraction, which was performed according to Lahiri&Schnabel [51], with some modifications by Vargas-Torres [50]. The quality of extracted DNA was checked by electrophoresis in a 1% agarose gel where an ethidium bromide stained single band was visualized under ultra-violet light. Subsequently, DNA fragments containing the *TNFR1* rs767455 (*TNFR1*+36A/G) and rs2234649 (*TNFR1*-383A/C) SNPs were amplified by PCR.

For both polymorphisms the reaction mixture was carried out in a total volume of 25 μl , containing 100 ng genomic DNA; 40.8 nmol of each primer *TNFR1* rs767455: FW 5'-GAGCCCAAATGGGGGAGTGAGAGG-3'; RV 5'-ACCAGGCCCGGGCAGGAGAG-3' [31]. The Primer-BLAST tool from the NCBI database was used to design the specific primer of *TNFR1*rs2234649 through its reference sequence (RefSeq) NG_007506.1:FW 5'-

TTATTGCCCTTGGTGTGGTTG-3'; RV 5'-
 TTGTGACGGAGTGAGAAGGGGAGG-3' (Invitrogen®); 100 mM of dNTP (Applied Biosystem®); 25 mM of MgCl₂; 2.5 µl of 5x buffer (Promega); 5U/µl of Taq DNA polymerase (Invitrogen®). PCR was performed in Thermal Cycler (Applied Biosystems). The cycles used were: 95°C (5 minutes), 35 cycles of 95°C (1 minute), 73°C (1 minute) and 72°C (1 minute) followed by 72°C (5 minutes) and 4°C (temperature of completion).

The resultant PCR products were digested using the restriction endonucleases *MspaAII* (*rs767455*) and *BglII*(*rs2234649*) at 37°C for 16 hours. The digested product was separated on a 3% agarose (Amersham Biosciences AB) gel stained with ethidium bromide. The resulting 183-bp fragment of *TNFR1 rs767455* digested with *MspaAII* produced a single 183bp fragment (A allele) or fragments of 108 and 75bp (G allele). *TNFR1 rs2234649* generated a 370bp fragment and digestion with *BglII* gave rise to a single 370bp fragment (A allele) or fragments of 240 and 130bp (C allele).

***In situ* expression of TNFR1 from cervical lesions**

Serial paraffin-embedded tissue sections (3 µm) were fixed in silane-coated slides. To determine the *in situ* expression of TNFR1, immunohistochemistry (IHC) technique was performed according to the REVEAL Biotin-Free Polyvalent HRP manufacturer's instructions (Spring, CA, USA). Sections were incubated overnight at 4°C with specific antibody against TNFR1 (1:100, Santa Cruz, Texas, USA). Positive stained cells were counted in twenty fields (400x) in the epithelium, basal layer of epithelium, stroma and perivascular areas of uterine cervix. Counts were performed using a grid (1 cm² divided into 10x10 mm²) by two different observers.

To ensure reproducibility, all cases were examined by two observers in order to derive concordance.

Statistical analysis

The Hardy–Weinberg equilibrium was tested comparing observed and expected genotype frequencies in the two studied groups (SIL and controls) using the χ^2 test. Differences in genotype, allele and haplotype combination frequencies between the group and subgroups of cases (patients with LSIL and HSIL) and controls or between the subgroups of cases were evaluated by a $2 \times 2 \chi^2$ contingency table or Fisher's exact test (in case of samples lower than 5) and a $3 \times 2 \chi^2$ for trend contingency table to evaluate the dominant model by Epi-Info Software. Three types of genetic models (dominant, co-dominant and recessive) were used for the association analysis of *TNFR1* polymorphisms with susceptibility to cervical neoplasia or severity of cervical lesion. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) of each genotype or allele compared with the reference genotype and allele were calculated to quantify the magnitude of the association. Uni and multivariate logistic regression analysis were used to define the significant of genetic predictor, with OR and 95% CI of SIL patients and LSIL and HSIL subgroups versus control group using clinical and environmental data, such as age, ethnicity, tobacco use, age of the first sexual intercourse, menarche and number of pregnancies, using SNPStats [<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>] Program. Further, the significant variables were also evaluated using Bonferroni correction, if applicable. Haplotype frequency and Pairwise Linkage disequilibrium (D') were determined using SNPStats. *TNFR1* mean of expressing cells was compared by two-way ANOVA test among SIL and control groups and among LSIL and HSIL subgroups and significant

variables were also corrected by Bonferroni post test, using GraphPad Prism 5. Significance was defined as p value <0.05.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: ATGF and MGBA. Clinically diagnosed samples were provided by FR, EK and EA-P; Sample Collection, Nucleic Acid isolation and performed the experiment: NPR, ATGF and ACP, Analyzed the data: NPR, ATGF, HER, JM and MGBA. Wrote the paper: NPR and ATGF. Contributed reagents/materials/ analysis tools: MGBA. Reviewed the paper: ATGF, HER, FR, JM and MGBA.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank MSc. Marcel Quintana for the statistical analyses support.

CONFLICTS OF INTEREST

None of the authors have conflicts of interest to declare related to this work.

FUNDING

Intramural research grant from Oswaldo Cruz Foundation and CAPES/Brazil for NPR doctoral fellowship

REFERENCES

1. Smith GD, Travis L. Getting to know human papillomavirus (HPV) and the HPV vaccines. *J Am Osteopath Assoc.* 2011; 111: S29-34.
2. Manini I, Montomoli E. Epidemiology and prevention of Human Papillomavirus. *Ann Ig Med Prev E Comunita.* 2018; 30: 28–32.
3. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis.* 2010; 202: 1789–99. doi: 10.1086/657321.
4. Ayres ARG, Silva GA e. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. *Rev Saude Publica.* 2010; 44: 963–74.
5. Wendland EM, Caierão J, Domingues C, Maranhão AGK, de Souza FMA, Hammes LS, Falavigna M, Hilgert JB, Hugo FN, Bessel M, Villa LL, Benzaken AS. POP-Brazil study protocol: a nationwide cross-sectional evaluation of the prevalence and genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in Brazil. *BMJ Open.* 2018; 8: e021170. doi: 10.1136/bmjopen-2017-021170.
6. Daniilidis A, Koutsos J, Oikonomou Z, Nasioutziki M, Hatziparadisi K, Tantanasis T. Cytokines of Cervical Mucosa and Human Papilloma Virus Infection of the Cervix: A Descriptive Study. *Acta Cytol.* 2016; 60: 58–64. doi: 10.1159/000445161.
7. Nicol AF, Fernandes ATG, Grinsztejn B, Russomano F, E Silva JRL, Tristão A, Pérez M de A, Nuovo GJ, Martínez-Maza O, Bonecini-Almeida M da G. Distribution of immune cell subsets and cytokine-producing cells in the uterine cervix of human papillomavirus (HPV)-infected women: influence of HIV-1 coinfection. *Diagn Mol Pathol Am J Surg Pathol Part B.* 2005; 14: 39–47.
8. Luo J-L, Maeda S, Hsu L-C, Yagita H, Karin M. Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell.* 2004; 6: 297–305. doi: 10.1016/j.ccr.2004.08.012.
9. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 276–85. doi: 10.1038/nrc1046.
10. Malejczyk J, Malejczyk M, Köck A, Urbanski A, Majewski S, Hunzelmann N, Jablonska S, Orth G, Luger TA. Autocrine growth limitation of human papillomavirus type 16-harboring keratinocytes by constitutively released tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1992; 149: 2702–8.
11. Bequet-Romero M, López-Ocejo O. Angiogenesis modulators expression in culture cell lines positives for HPV-16 oncoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 277: 55–61. doi: 10.1006/bbrc.2000.3628.
12. Duerksen-Hughes PJ, Yang J, Schwartz SB. HPV 16 E6 blocks TNF-mediated apoptosis in mouse fibroblast LM cells. *Virology.* 1999; 264: 55–65. doi: 10.1006/viro.1999.9977.

13. Filippova M, Song H, Connolly JL, Dermody TS, Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2002; 277: 21730–9. doi: 10.1074/jbc.M200113200.
14. Thompson DA, Zacny V, Belinsky GS, Classon M, Jones DL, Schlegel R, Münger K. The HPV E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in normal human fibroblasts. *Oncogene*. 2001; 20: 3629–40. doi: 10.1038/sj.onc.1204483.
15. Das CR, Tiwari D, Dongre A, Khan MA, Husain SA, Sarma A, Bose S, Bose PD. Deregulated TNF-Alpha Levels Along with HPV Genotype 16 Infection Are Associated with Pathogenesis of Cervical Neoplasia in Northeast Indian Patients. *Viral Immunol*. 2018; 31: 282–91. doi: 10.1089/vim.2017.0151.
16. Tartaglia LA, Pennica D, Goeddel DV. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem*. 1993; 268: 18542–8.
17. Glossop JR, Nixon NB, Dawes PT, Hassell AB, Matthey DL. No association of polymorphisms in the tumor necrosis factor receptor I and receptor II genes with disease severity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2003; 30: 1406–9.
18. Chatzikyriakidou A, Georgiou I, Voulgari PV, Drosos AA. The role of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptor polymorphisms in susceptibility to ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol*. 2009; 27: 645–8.
19. Waschke KA, Villani A-C, Vermeire S, Dufresne L, Chen T-C, Bitton A, Cohen A, Thomson ABR, Wild GE. Tumor necrosis factor receptor gene polymorphisms in Crohn's disease: association with clinical phenotypes. *Am J Gastroenterol*. 2005; 100: 1126–33. doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.40534.x.
20. Sainz J, Salas-Alvarado I, López-Fernández E, Olmedo C, Comino A, García F, Blanco A, Gómez-Lopera S, Oyonarte S, Bueno P, Jurado M. TNFR1 mRNA expression level and TNFR1 gene polymorphisms are predictive markers for susceptibility to develop invasive pulmonary aspergillosis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2010; 23: 423–36. doi: 10.1177/039463201002300205.
21. Fletes-Rayas AL, Palafox-Sánchez CA, Muñoz-Valle JF, Orozco-Barocio G, Navarro-Hernández RE, Oregon-Romero E. TNFR1-383 A>C polymorphism association with clinical manifestations in primary Sjögren's syndrome patients. *Genet Mol Res GMR*. 2016; 15. doi: 10.4238/gmr.15024177.
22. Omatsu H, Kuwahara A, Yamamori M, Fujita M, Okuno T, Miki I, Tamura T, Nishiguchi K, Okamura N, Nakamura T, Azuma T, Hirano T, Ozawa K, et al. TNF- α -857C>T genotype is predictive of clinical response after treatment with definitive 5-fluorouracil/cisplatin-based chemoradiotherapy in Japanese patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Med Sci*. 2013; 10: 1755–60. doi: 10.7150/ijms.6749.
23. Wu M-S, Chen L-T, Shun C-T, Huang S-P, Chiu H-M, Wang H-P, Lin M-T, Cheng A-L, Lin J-T. Promoter polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha are associated with risk of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Int J Cancer*. 2004; 110: 695–700. doi: 10.1002/ijc.20199.

24. Kim S, Moon S-M, Kim YS, Kim J-J, Ryu H-J, Kim Y-J, Choi J-W, Park H-S, Kim D-G, Shin H-D, Rutherford MS, Oh B, Lee J-K. TNFR1 promoter -329G/T polymorphism results in allele-specific repression of TNFR1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 368: 395–401. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.01.098.
25. Lee EB, Jeon H-S, Yoo SS, Choi YY, Kang H-G, Cho S, Cha S-I, Choi JE, Park T-I, Lee B-H, Park R-W, Kim I-S, Kang YM, et al. Polymorphisms in apoptosis-related genes and survival of patients with early-stage non-small-cell lung cancer. *Ann Surg Oncol*. 2010; 17: 2608–18. doi: 10.1245/s10434-010-1082-4.
26. Wu I-C, Zhao Y, Zhai R, Liu C, Chen F, Ter-Minassian M, Asomaning K, Su L, Heist RS, Kulke MH, Liu G, Christiani DC. Interactions between genetic polymorphisms in the apoptotic pathway and environmental factors on esophageal adenocarcinoma risk. *Carcinogenesis*. 2011; 32: 502–6. doi: 10.1093/carcin/bgq287.
27. Gupta R, Sharma SC, Das SN. Association of TNF-alpha and TNFR1 promoters and 3' UTR region of TNFR2 gene polymorphisms with genetic susceptibility to tobacco-related oral carcinoma in Asian Indians. *Oral Oncol*. 2008; 44: 455–63. doi: 10.1016/j.oraloncology.2007.06.003.
28. Rittore C, Sanchez E, Soler S, Barat-Houari M, Albers M, Obici L, McDermott MF, Touitou I, Grandemange S. Identification of a new exon 2-skipped TNFR1 transcript: regulation by three functional polymorphisms of the TNFR-associated periodic syndrome (TRAPS) gene. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73: 290–7. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-203023.
29. Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Takatsuka N, Mitsuhashi A, Fujii T, Hirai Y, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, et al. Predicting the progression of cervical precursor lesions by human papillomavirus genotyping: a prospective cohort study. *Int J Cancer*. 2011; 128: 2898–910. doi: 10.1002/ijc.25630.
30. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2005; 32 Suppl 1: S16-24. doi: 10.1016/j.jcv.2004.12.008.
31. Monnier-Benoit S, Dalstein V, Riethmuller D, Lalaoui N, Mouglin C, Pr etet JL. Dynamics of HPV16 DNA load reflect the natural history of cervical HPV-associated lesions. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2006; 35: 270–7. doi: 10.1016/j.jcv.2005.09.001.
32. Hellberg D, Nilsson S, Haley NJ, Hoffman D, Wynder E. Smoking and cervical intraepithelial neoplasia: nicotine and cotinine in serum and cervical mucus in smokers and nonsmokers. *Am J Obstet Gynecol*. 1988; 158: 910–3.
33. Melikian AA, Sun P, Prokopczyk B, El-Bayoumy K, Hoffmann D, Wang X, Waggoner S. Identification of benzo[a]pyrene metabolites in cervical mucus and DNA adducts in cervical tissues in humans by gas chromatography-mass spectrometry. *Cancer Lett*. 1999; 146: 127–34.
34. Nadais R da F, Campaner AB, Piato S, Longo Galv ao MA, dos Santos RE, Aoki T. Langerhans' cells and smoking in intraepithelial neoplasia of the cervix. *Gynecol Oncol*. 2006; 102: 356–60. doi: 10.1016/j.ygyno.2005.12.030.
35. Hubert P, van den Br ule F, Giannini SL, Franzen-Detrooz E, Boniver J, Delvenne P. Colonization of in vitro-formed cervical human papillomavirus-associated (pre)neoplastic

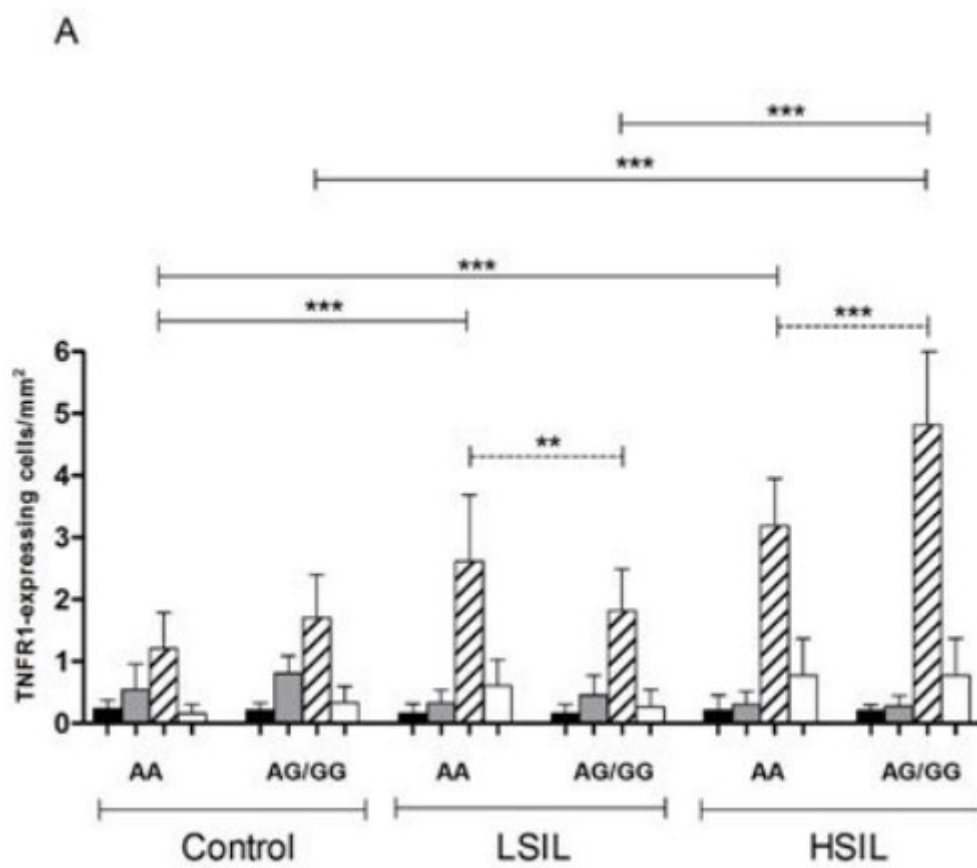
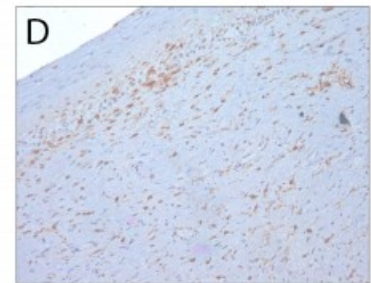
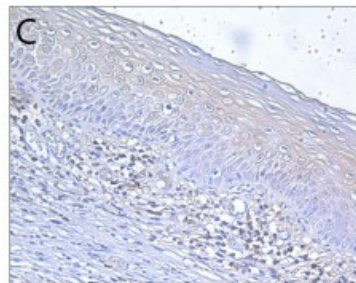
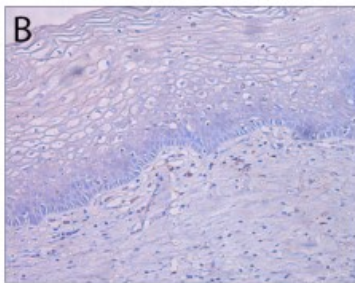
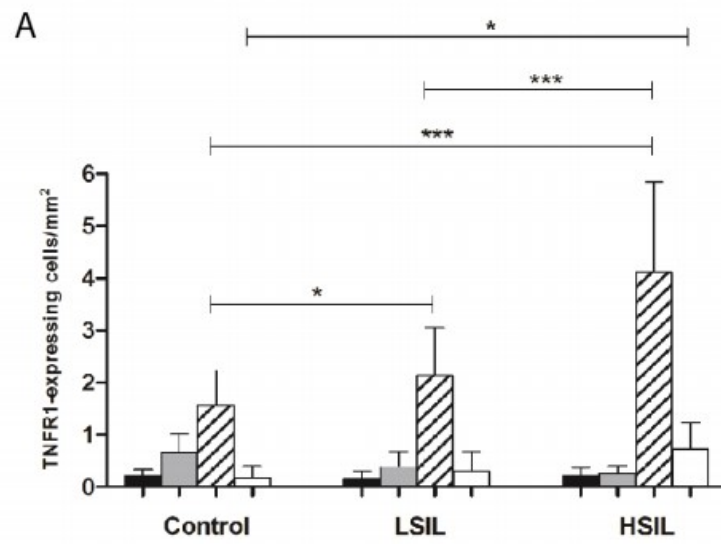
- lesions with dendritic cells: role of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Am J Pathol.* 1999; 154: 775–84. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65324-2.
36. Nishimura M, Maeda M, Matsuoka M, Mine H, Saji H, Matsui M, Kuroda Y, Kawakami H, Uchiyama T. Tumor necrosis factor, tumor necrosis factor receptors type 1 and 2, lymphotoxin-alpha, and HLA-DRB1 gene polymorphisms in human T-cell lymphotropic virus type I associated myelopathy. *Hum Immunol.* 2000; 61: 1262–9.
 37. Madeleine MM, Johnson LG, Malkki M, Resler AJ, Petersdorf EW, McKnight B, Malone KE. Genetic variation in proinflammatory cytokines IL6, IL6R, TNF-region, and TNFRSF1A and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 129: 887–99. doi: 10.1007/s10549-011-1520-4.
 38. Xu F, Zhou G, Han S, Yuan W, Chen S, Fu Z, Li D, Zhang H, Li D, Pang D. Association of TNF- α , TNFRSF1A and TNFRSF1B gene polymorphisms with the risk of sporadic breast cancer in northeast Chinese Han women. *PLoS One.* 2014; 9: e101138. doi: 10.1371/journal.pone.0101138.
 39. Ilic B, Nikolic N, Andric M, Jelovac D, Milicic B, Jozic T, Krstic S, Milasin J. TNF- α (-308G>A) and TNF-R1 (36A>G) single nucleotide polymorphisms are strong risk factors for odontogenic keratocystic tumor development. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol.* 2017; 46: 292–6. doi: 10.1111/jop.12564.
 40. Arnott CH, Scott KA, Moore RJ, Robinson SC, Thompson RG, Balkwill FR. Expression of both TNF-alpha receptor subtypes is essential for optimal skin tumour development. *Oncogene.* 2004; 23: 1902–10. doi: 10.1038/sj.onc.1207317.
 41. Eder P, Łykowska-Szuber L, Krela-Kaźmierczak I, Stawczyk-Eder K, Iwanik K, Majewski P, Sterzyńska K, Zabel M, Linke K. Disturbances in apoptosis of lamina propria lymphocytes in Crohn's disease. *Arch Med Sci AMS.* 2015; 11: 1279–85. doi: 10.5114/aoms.2015.54203.
 42. Dobrzycka B, Terlikowski SJ, Garbowicz M, Niklińska W, Bernaczyk PS, Nikliński J, Kinalski M, Chyczewski L. Tumor necrosis factor-alpha and its receptors in epithelial ovarian cancer. *Folia Histochem Cytobiol.* 2009; 47: 609–13. doi: 10.2478/v10042-008-0117-1.
 43. Ma X, Li X, Lu X, Jia L, Li H, Song Q. Interaction between TNFR1 and TNFR2 dominates the clinicopathologic features of human hypopharyngeal carcinoma. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 2015; 36: 9421–9. doi: 10.1007/s13277-015-3684-8.
 44. Aguilar-Lemarroy A, Kirchhoff S, Whitaker N, Gariglio P, zur Hausen H, Krammer PH, Rösl F. Differential sensitivity of human papillomavirus type 16(+) and type 18(+) cervical carcinoma cells to CD95-mediated apoptosis. *Int J Cancer.* 2001; 93: 823–31.
 45. Alves DB, Tozetti IA, Gatto FA, Cassandri F, Ferreira AMT, Carlos Eurico Dos Santos F, Falcão GR, Scapulatempo IDL, Padovani CTJ, Abdo MAGS. [CD4 and CD8 T lymphocytes and NK cells in the stroma of the uterine cervix of women infected with human papillomavirus]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010; 43: 425–9.
 46. Rossol M, Schubert K, Meusch U, Schulz A, Biedermann B, Grosche J, Pierer M, Scholz R, Baerwald C, Thiel A, Hagen S, Wagner U. Tumor necrosis factor receptor type I expression of CD4+ T cells in rheumatoid arthritis enables them to follow tumor necrosis factor

- gradients into the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 2013; 65: 1468–76. doi: 10.1002/art.37927.
47. Ji H, Cao R, Yang Y, Zhang Y, Iwamoto H, Lim S, Nakamura M, Andersson P, Wang J, Sun Y, Dissing S, He X, Yang X, et al. TNFR1 mediates TNF- α -induced tumour lymphangiogenesis and metastasis by modulating VEGF-C-VEGFR3 signalling. *Nat Commun.* 2014; 5: 4944. doi: 10.1038/ncomms5944.
 48. de Andrade ACV, Luz PM, Velasque L, Veloso VG, Moreira RI, Russomano F, Chicarino-Coelho J, Pires E, Levi JE, Grinsztejn B, Friedman RK. Factors associated with colposcopy-histopathology confirmed cervical intraepithelial neoplasia among HIV-infected women from Rio De Janeiro, Brazil. *PloS One.* 2011; 6: e18297. doi: 10.1371/journal.pone.0018297.
 49. Portari EA, Russomano FB, de Camargo MJ, Machado Gayer CR, da Rocha Guillobel HC, Santos-Rebouças CB, Brito Macedo JM. Immunohistochemical expression of cyclin D1, p16Ink4a, p21WAF1, and Ki-67 correlates with the severity of cervical neoplasia. *Int J Gynecol Pathol Off J Int Soc Gynecol Pathol.* 2013; 32: 501–8. doi: 10.1097/PGP.0b013e31826f5cf6.
 50. Vargas-Torres SL, Portari EA, Klumb EM, Guillobel HC da R, de Camargo MJ, Russomano FB, Macedo JMB. Association of CDKN2A polymorphisms with the severity of cervical neoplasia in a Brazilian population. *Biomark Biochem Indic Expo Response Susceptibility Chem.* 2014; 19: 121–7. doi: 10.3109/1354750X.2014.881419.
 51. Lahiri DK, Schnabel B. DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. *Biochem Genet.* 1993; 31: 321–8.

Legends to Figures

Fig. 1 Distribution (A) and immunohistochemistry (B-D) evaluation of TNFR1 expressing cells in uterine cervix from healthy control (B), low (C) and high (D) squamous intraepithelial lesions. Staining distribution was identified in epithelium (black bars), basal layer of epithelium (light gray bars), stroma (lined bars) and perivascular area (white bars). Two-way Anova, after Bonferroni correction test * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$. Magnification of 200X.

Fig. 2 Distribution of TNFR1 expressing cells in uterine cervix from low (LSIL) and high (HSIL) squamous intraepithelial lesions and control groups carrying TNFR1 rs767455 A>G (A) and TNFR1 rs2234649 A>C (B) polymorphism in epithelium (black bars), basal layer of epithelium (light gray bars), stroma (lined bars) and perivascular area (white bars). Dotted lines indicate intragroups analysis and simple lines indicate intergroups analysis. Two-way Anova, after Bonferroni correction test * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.



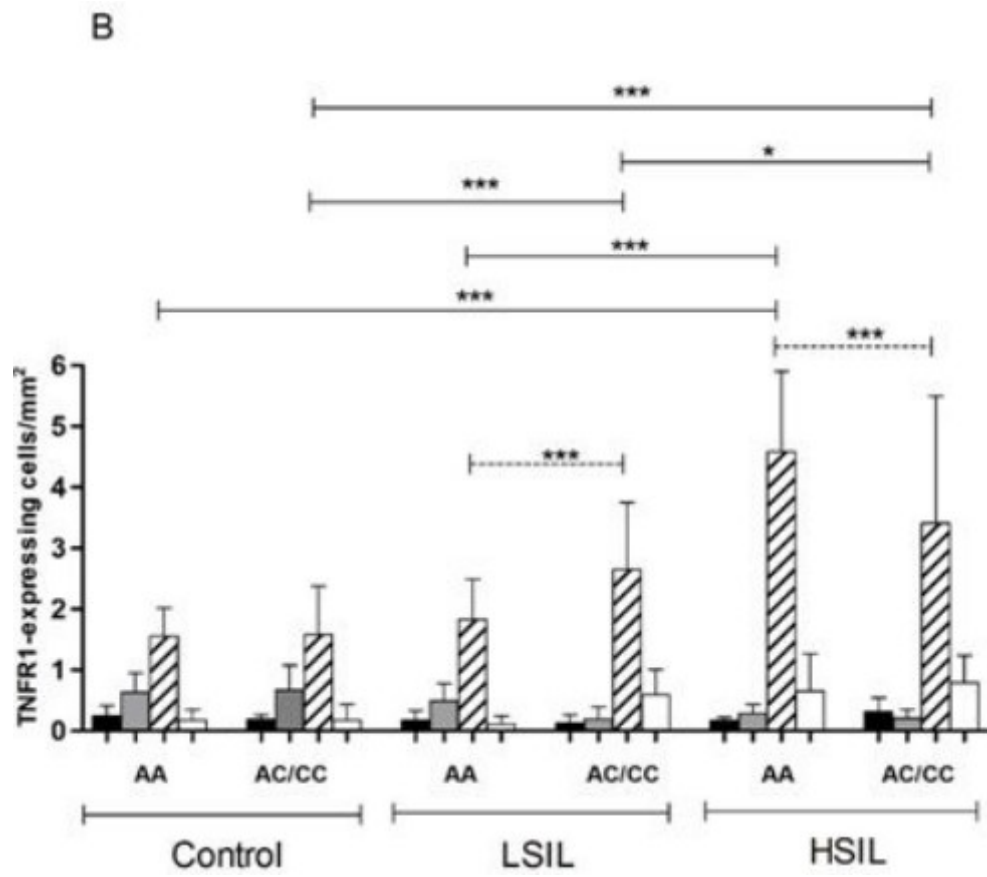


Table 1. Clinical and environmental data

	Control n= 227(%)	SIL n= 179(%)	LSIL n= 78(%)	HSIL n= 101(%)	<i>p</i> *	<i>p</i> **	<i>p</i> ***
<i>Age years (mean ± SD)</i>	34.78 ± 10.62	37.70 ± 10.75	35.95 ± 10.72	39.05 ± 10.63	<0.01 ^a	>0.05 ^a	<0.01 ^a
<i>Ethnicity (n, %)</i>							
White	87 (38)	61 (34)	31 (40)	30 (30)	0.01 ^b	0.148 ^b	0.006 ^b
Afro-Brazilian	133 (59)	113 (63)	46 (59)	67 (66)			
Indigen	-	2 (1)	1 (1)	1 (1)			
Asian-Brazilian	-	3 (2)	-	3 (3)			
No determined	7 (3)	-	-	-			
<i>Tobacco use (n, %)</i>							
Yes	80 (35)	99 (55)	37 (47)	62 (61)	0.08 ^c	0.86 ^c	0.015 ^c
No	93 (41)	80 (45)	41 (53)	39 (39)			
Unknown	54 (24)	-	-	-			
<i>Age at first sexual intercourse (average ± SD)</i>	18.10 ± 3.50	17.27 ± 3.70	17.72 ± 4.09	16.92 ± 3.35	<0.001 ^a	>0.05 ^a	<0.001 ^b
<i>Menarche (average ± SD)</i>	12.73 ± 1.73	12.66 ± 1.62	12.65 ± 1.80	12.66 ± 1.49	>0.05 ^a	>0.05 ^a	>0.05 ^a
<i>Number of pregnancies (average ± SD)</i>	2.31 ± 1.72	2.55 ± 1.88	2.17 ± 1.83	2.85 ± 1.82	>0.05 ^a	>0.05 ^a	>0.05 ^a

SIL, Squamous Intraepithelial Lesions; LSIL, Low SIL; HSIL, High SIL

* *p* value comparing SIL with control, ** *p* value comparing LSIL with control, *** *p* value comparing HSIL with control^a Unpaired *t* test, Mann-Whitney^b Two way contingency table, from χ^2 test^c Two sided, from χ^2 test

Table 2. Logistic regression analysis of associations between *TNFR1 rs767455 A>G* and *TNFR1 rs2234649 A>C* polymorphisms and risk of squamous intraepithelial lesions

Polymorphisms	Control n=227 (%)	SIL n=179 (%)	<i>p</i>	OR (95% CI)
<i>TNFR1 rs767455 A>G</i>				
AA	101 (44)	79 (44)	0.55 ^a	1
GA	106 (47)	77 (43)		0.92
GG	20 (9)	23 (13)		1.47
AA	101 (44)	79 (44)	0.94 ^b	1
GA+GG	126 (56)	100 (56)		0.98 (0.66-1.46)
GG	20 (9)	23 (13)	0.18 ^b	1
AA+GA	207 (91)	156 (87)		1.52 (0.80-2.87)
<i>Alleles</i>				
A	308 (68)	235 (66)	0.50 ^b	1
G	146 (32)	123 (34)		0.90 (0.67-1.21)
<i>TNFR1 rs2234649 A>C</i>				
AA	175 (77)	135 (75)	0.77 ^a	1
AC	45 (20)	38 (21)		1.09
CC	7 (3)	6 (4)		1.11
AA	175 (77)	135 (75)	0.69 ^b	1
AC+CC	52 (23)	44 (25)		0.91 (0.57-1.44)
CC	7 (3)	6 (4)	0.87 ^b	1
AA+AC	220 (97)	173 (96)		1.09 (0.35-3.30)
<i>Alleles</i>				
A	392 (87)	308 (86)	0.71 ^b	1
C	59 (13)	50 (14)		0.92 (0.61-1.39)

SIL squamous intraepithelial lesion; OR, odds ratio

^a *p* value, two sided, from χ^2 test for trend

^b *p* value, two sided, from χ^2 test

Table 3. Logistic regression analysis of associations between TNFR1 rs767455 A>G and TNFR1 rs2234649 A>C polymorphisms and risk of squamous intraepithelial lesions progression

	SIL (n=179)						
	Control n= 227 (%)	LSIL n= 78 (%)	<i>p</i> [*]	OR (95% CI)	HSIL n= 101 (%)	<i>p</i> ^{**}	OR (95% CI)
<i>TNFR1</i> rs767455 A>G							
AA	101 (44)	30 (38)	0.34 ^a	1	49 (48)	0.96 ^a	1
AG	106 (47)	39 (50)		1.23	38 (38)		0.73
GG	20 (9)	9 (12)		1.51	14 (14)		1.43
AA	101 (44)	30 (38)	0.35 ^b	1	49 (48)	0.49 ^b	1
AG+GG	126 (56)	48 (62)		0.77 (0.46-1.31)	52 (52)		1.17 (0.80-3.44)
GG	20 (9)	9 (12)	0.47 ^b	1	14 (14)	0.16 ^b	1
AG+AA	207 (91)	69 (88)		1.35 (0.58-3.10)	87 (86)		1.66 (0.73-1.88)
Alleles							
A	308 (68)	99 (63)	0.27 ^b	1	136 (67)	0.89 ^b	1
G	146 (32)	57 (37)		0.80 (0.55-1.18)	66 (33)		0.97 (0.68-1.39)
<i>TNFR1</i> rs2234649 A>C							
AA	175 (77)	58 (74)	0.56 ^a	1	77 (76)	0.87 ^a	1
AC	45 (20)	16 (21)		1.07	22 (22)		1.11
CC	7 (3)	4 (5)		1.72	2 (2)		0.64
AA	175 (77)	58 (74)	0.62 ^b	1	77 (76)	0.86 ^b	1
AC+CC	52 (23)	20 (26)		0.86 (0.47-1.56)	24 (24)		0.95 (0.54-1.65)
CC	7 (3)	4 (5)	0.40 ^b	1	2 (2)	0.57 ^b	1
AC+AA	220 (97)	74 (95)		1.69 (0.35-6.89)	99 (98)		0.63 (0.06-3.41)
Alleles							
A	395 (87)	132 (85)	0.45 ^b	1	176 (87)	0.94 ^b	1
C	59 (13)	24 (15)		0.82 (0.49-1.37)	26 (13)		1.01 (0.62-1.67)

SIL squamous intraepithelial lesion, LSIL, Low SIL; HSIL, High SIL; OR, odds ratio

^a *p* value, two sided, from χ^2 test for trend,

^b *p* value, two sided, from χ^2 test

* *p* value comparing LSIL with control

** *p* value comparing HSIL with control

11.2 Artigo publicado na revista *Apoptosis*

Apoptosis
DOI 10.1007/s10495-015-1156-7



ORIGINAL PAPER

Polymorphism in apoptotic *BAX* (-248G>A) gene but not in anti-apoptotic *BCL2* (-938C>A) gene and its protein and mRNA expression are associated with cervical intraepithelial neoplasia

Ana Teresa G. Fernandes¹ · Natália P. Rocha¹ · Elena Vendrame^{2,8} ·
Fabio Russomano³ · Beatriz J. Grinsztejn⁴ · Ruth K. Friedman⁴ ·
Amanda C. Pinto⁵ · Evandro M. Klumb⁶ · Elyzabeth Avvad⁷ ·
Jaclyra Macedo⁵ · Otoniel Martínez-Maza^{2,8} · Maria da Gloria Bonecini-Almeida¹

© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract HPV is associated with cervical cancer and plays a crucial role in tumor formation. Apoptosis is regulated by different pathways involving genes that either promote (*BCL2* gene) or inhibit (*BAX* gene) cell death. Our goal was to determine whether the *BCL2*-938C>A (rs2279115) and *BAX*-248G>A (rs4645878) single nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with squamous intraepithelial neoplasia (SIL) risk, and whether their phenotypic expression was impaired in these lesions. Two hundred and thirty-one cases showing SIL were classified as low SIL (LSIL, n = 101) or high SIL (HSIL, n = 130), and

control subjects (n = 266) with no gynecologically proven SIL were recruited. No statistical difference in the genotype and allelic frequency of the *BCL2*-938C>A polymorphism was observed among the groups. *BCL2*-938C/A and A/A homozygotes carriers had higher distribution of *BCL2*-expressing cells in stroma in the SIL group. *BCL2* mRNA-expression was not correlated with *BCL2*-938C>A SNPs in both groups. We did find a strong association of the *BAX* GG genotype and risk for SIL. No difference was observed between LSIL and HSIL groups. In *BAX*-248G/A and A/A homozygote carriers, the number of *BAX*-expressing cells was lower the epithelium area in SIL. However, mRNA expression was higher in SIL patients than in the control group. In conclusion, our data provide evidence that allele G carriers in the *BAX*-248G>A promoter SNP may influence the development of SIL. However, this genotype does not influence the SIL outcome. Additionally, we suggest a possible role of HPV infection in the inhibition of the expression of *BAX* protein, decreasing cell death, and favoring cervical carcinogenesis.

✉ Maria da Gloria Bonecini-Almeida
gloria.bonecini@ini.fiocruz.br

¹ Laboratory of Immunology and Immunogenetics in Infectious Diseases, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Avenida Brasil 4365, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil

² Departments of Obstetrics & Gynecology and Microbiology, Immunology and Molecular Genetics, David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, CA, USA

³ Department of Gynecology, Fernandes Figueira Woman, Child and Adolescent National Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

⁴ STD/AIDS Clinical Research Laboratory, INI, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

⁵ Department of Biochemistry, State University of Rio de Janeiro - UERJ, Rio de Janeiro, Brazil

⁶ Rheumatology Department Lupus Clinic, State University, Rio de Janeiro, Brazil

⁷ Department of Pathologic Anatomy, Fernandes Figueira Woman, Child and Adolescent National Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

⁸ Department of Epidemiology, UCLA Fielding School of Public Health, Los Angeles, CA, USA

Keywords Cervical lesions · Apoptosis markers · Polymorphism · mRNA and protein expression

Introduction

Cervical cancer was the 4th cause of cancer death in 2013 [1] and is the second most frequent cancer in women worldwide. Approximately 500,000 new cervical cancer cases and 273,505 cervical cancer deaths are reported per year [2]. Human papillomaviruses (HPVs) are associated with cervical cancer in most instances, and the early genes E6 and E7 from high-risk HPVs play a crucial role in tumor

formation, altering cell cycle control and downregulating the function of the tumor suppressors p53 and Rb [3]. Various lines of evidence indicate that HPV infection is necessary but not sufficient for induction of the malignant changes and that other factors are involved [4], such as ethnicity, age, age of menarche, age at first sexual intercourse, number of pregnancies, and tobacco use [5].

Apoptosis is regulated by different pathways involving a number of genes that either promote or inhibit cell death. The balance between death antagonists and agonists determines whether a cell will survive or undergo apoptosis. The best characterized apoptosis regulators include the anti-apoptotic B cell lymphoma 2 (*BCL2*) and the pro-apoptotic B-cell lymphoma 2-associated X (*BAX*) proteins. The protein products of these two genes physically interact with each other, and their relative levels are important determinants of the apoptosis rate [6, 7]. The HPV E6 oncoprotein has been associated with the modulation of a wide range of apoptosis regulators that belong to the extrinsic (CD95 or FADD) and intrinsic (*BAX* or *BCL2*) pathways or are common regulators to both pathways, such as the anti-apoptotic c-IAP2 protein [8, 9]. The *BCL2* gene is located on chromosome 18q21.3, and a promoter gene single nucleotide polymorphism (SNP), the -938C>A genotype (rs2279115), is known to be correlated with high *BCL2* protein expression and is associated with disease progression in chronic lymphocytic leukemia (CLL) [10], oropharyngeal squamous cell carcinoma [11], prostate carcinoma [12], and epithelial ovarian cancer [13]. The *BAX* gene has been mapped to chromosome 19q13.3. A SNP located within the 5' untranslated region of the *BAX* promoter, -248G>A (rs4645878), has been described, and the A allele was reported to be associated with both reduced expression of *BAX* protein [14] and altered susceptibility to chronic lymphocytic leukemia [15–18].

To our knowledge, there is no report examining the association of *BAX* and *BCL2* polymorphisms with squamous intraepithelial neoplasia (SIL) and/or cancer risk. Our goal was to determine whether of *BAX*-248G>A and *BCL2*-938C>A promoter polymorphisms are associated with risk of SIL, and whether their phenotypic expression was impaired in HPV cervical lesions.

Materials and methods

Study population

From November 2008 to October 2010, 514 women were enrolled for this *BAX* and *BCL2* SNP genotypic study. Patients with histologically confirmed squamous intraepithelial lesion (SIL, $n = 231$) were enrolled consecutively from two cohorts followed at Fiocruz Clinical Care Units

in Rio de Janeiro, RJ, Brazil: Fernandes Figueira Woman, Child and Adolescent National Institute (IFF, $n = 182$), and Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (INI, $n = 49$). All patients received free appropriate clinical treatment [19] and provided written consent approved by the Institutional Review Board from INI and IFF/Fiocruz. HIV status was identified in all volunteers. According to the histopathological analysis at the baseline gynecological visit, two groups were defined as having low (LSIL) and high (HSIL) grade squamous intraepithelial lesion. Control subjects with no proven lesions and who were genetically unrelated to the SIL cases were recruited from three Clinical Sites in Rio de Janeiro, RJ, Brazil: INI ($n = 66$); IFF ($n = 17$) and State University of Rio de Janeiro (UERJ), including the Piquet Carneiro Gynecology Ambulatory and Pedro Ernesto Hospital ($n = 200$). A standardized questionnaire was used to collect clinical and demographic data, including age, self determined ethnicity, age, tobacco use, age at first sexual intercourse, menarche and number of pregnancies. Case and control groups were matched by clinical and demographic data.

To demonstrate whether *BAX* and *BCL2* SNPs and/or gene expression are associated with cervical lesions, we analyzed both mRNA and protein expression and compared these to the genetic frequencies. To achieve this goal, 66 volunteers were selected from the genetic study described above. Additional identification of HPV E6 and E7 oncoproteins were evaluated in those volunteers.

BCL2 and *BAX* genotyping

Genomic DNA was isolated with the QIAGEN DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. Restriction fragment length polymorphism–polymerase chain reaction (RFLP-PCR) was performed to identify *BCL2*-938C>A and *BAX*-248G>A polymorphisms in the promoter regions. Each PCR was performed in a 25 μ L reaction mixture containing 50 ng of genomic DNA templates, 12.5 pmol of each primer, 0.1 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 1X PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, and 0.1 % Triton X-100), 1.5 mM MgCl₂, and 1.5 U Taq polymerase (Promega Corporation, Madison, WI). The PCR profile consisted of an initial melting step at 96 °C for 5 min followed by 35 cycles at 96 °C for 45 s, at 60 °C for 40 s, and at 72 °C for 30 s, and a final extension step at 72 °C for 10 min.

For the *BCL2*-938C>A polymorphism in the promoter, the primers (5'-CTGCCTTCATTATCCAGCA-3' and 5'-GGCGGCAGATGAATTACAA-3') amplified a 300-bp DNA fragment. The PCR product was digested by *Bcl*I (New England Biolabs, Beverly, MA) overnight at 37 °C. The wild-type allele (CC) produced two bands of 189 and

111 bp; the wild-type/variant allele (CA) produced three bands of 111, 189, and 300 bp, and the variant allele (AA) produced a single 300-bp band [20].

For the *BAX*-248G>A polymorphism, the primers (5'-CATTAGAGCTGCGATTGGACCG-3' and 5'-GCTCCCTCGGGAGGTTTGGT-3') amplified a 109-bp DNA fragment. The PCR product was digested by *MspI* (New England Biolabs, Beverly, MA) overnight at 37 °C. The digested product was separated on a 2.5 % NuSieve 3:1 agarose (FMC BioProducts, Rockland, ME) gel with ethidium bromide. The homozygote (GG) wild-type allele produced two bands (89 and 20 bp), and the wild-type/variant allele (GA) produced 20, 89, and 109 bp bands; the variant allele (AA) lacks the *MspI* restriction site and therefore produced a single 109-bp band.

Expression of apoptotic markers in cervical lesions

Sixty-six (49 cases and 17 controls) volunteers were selected from the genetic study described above to perform the biological identification of *BAX* and *BCL2* protein and mRNA expression and to further correlate its expression to the specific genotypes of *BAX* (-248G<A) and *BCL2* (-938C<A).

Immunoperoxidase staining was performed as described previously by our group [21]. Sections were incubated overnight at 4 °C with specific antibodies against *BAX* (Zymed, South San Francisco, California, USA) and *BCL2* (BD Pharmingen, Heidelberg, Germany). Positive stained cells were counted in twenty fields ($\times 400$) in the epithelium, basal layer of epithelium, stroma and perivascular fields of uterine cervix. Counts were performed using a grid (1 cm² divided into 10 \times 10 mm²) by two different observers.

Analysis of mRNA expression from paraffin-embedded cervical biopsies tissue Sects. (10 μ m) were performed. Whole cervical tissue homogenates were prepared according to the procedure described in the QuantiGene Sample Processing Kit for FFPE Tissues (Panomics, Inc., Fremont, CA). *BAX*, *BCL2* and E6 and E7 oncoprotein mRNA expression was analyzed using QuantiGene Plex 2.0 assay (Affymetrix, Santa Clara, CA) as described previously [22]. This methodology combines branched DNA (bDNA) signal amplification and multi-analyte profiling beads (xMAP[®]) technologies to enable the detection and quantitation of multiple RNA targets simultaneously. The bDNA assay is a hybridization-based method of target-specific RNA quantitation that amplifies signal rather than target RNA, using labeled DNA probes. The housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) was used as internal positive control.

Statistical analysis

The deviation from Hardy–Weinberg equilibrium was determined for genotyping by the Chi square test (χ^2) in both SIL patients and control group. We used the χ^2 test to compare the differences in each allele and genotype of *BCL2* and *BAX* polymorphism frequency. Additionally, we used unconditional univariate and multivariate logistic regression analyses to examine the associations between the selected SNPs and SIL risk by estimating the odds ratios (ORs) and 95 % confidence intervals (CIs) with and without adjustment for age, self determined ethnicity, age, tobacco use, age at first sexual intercourse, menarche and number of pregnancies between SIL cases and control group. To evaluate interactions between *BCL2* and *BAX* genotypes in the risk of development of low and high SIL, logistic regression analysis was also used to assess potential interactions by evaluating departures from additive and multiplicative interaction models, comparing LSIL and HSIL subgroups among themselves and with controls.

Protein and mRNA apoptotic markers expression in LSIL and HSIL subgroups were compared with control group. For the mRNA analysis, the *GAPDH* housekeeping gene was used for normalization of *BAX* and *BCL2* expression. Data analysis was carried out using the SPSS (version 16.0, September 2007). Student *t* test and Mann–Whitney test were used to compare means of positive cells in a particular area of tissue. Spearman's rho was used to investigate correlation among apoptotic markers expression.

All statistical tests were two-sided, a *p* value of 0.05 was considered significant, and analyses were performed using Epi Info 6 (Version 6.04, July 1996), SNPStats [29], and SPSS (Version 16, September 2007).

Results

Characteristics of the study population

A total of 514 women were enrolled for the genotyping study from Clinical Sites. Two hundred and thirty-one cases yielded SIL, classified as either LSIL (*n* = 102) or HSIL (*n* = 129). Two hundred eighty-three women showed no lesions upon gynecological evaluation and were enrolled as healthy control subjects. Table 1 describes clinical and behavior data on each study group. Patients (37.79 \pm 10.14 years old) and controls (46.15 \pm 6.19 years old) groups social and environmental data were identified such as age, self determined ethnicity, tobacco use, age at first sexual intercourse, menarche and number of pregnancies. No significant difference was found between SIL and control groups in all co-variables described, except in tobacco use (*p* = 0.009). In the LSIL and HSIL subgroups, the average age was 37.13 \pm 10.48 and 38.31 \pm 9.87 years,

Table 1 Clinical and environmental data

	Squamous Intraepithelial lesions			Control (n = 283)	p
	ALL (n = 231)	LSIL (n = 102)	HSIL (n = 129)		
Age years (average \pm SD)	37.79 \pm 10.14	37.13 \pm 10.48	38.31 \pm 9.87	46.15 \pm 6.19	0.06 ^a
Ethnicity (n, %)					
White	80 (34.6)	42 (41.2)	38 (29.5)	109 (38.5)	0.67 ^b
Afro-Brazilian	145 (62.8)	59 (57.8)	86 (66.6)	169 (59.7)	
Indigen	2 (0.9)	1 (1)	1 (0.8)	2 (0.7)	
Asian-Brazilian	3 (1.3)	–	3 (2.3)	1 (0.4)	
No determined	1 (0.4)	–	1 (0.8)	2 (0.7)	
Tobacco use (n, %)					
Yes	121 (52.4)	42 (41.2)	79 (61.2)	113 (40.0)	0.009 ^c
No	110 (47.6)	60 (58.8)	50 (38.8)	164 (57.9)	
Unknown	–	–	–	6 (2.1)	
Age at first sexual intercourse (average \pm SD)	17.36 \pm 3.88	17.9 \pm 4.3	16.95 \pm 3.48	19.85 \pm 2.90	0.23 ^a
Menarche (average \pm SD)	12.72 \pm 1.6	12.75 \pm 1.69	12.71 \pm 1.54	12.84 \pm 1.68	0.32 ^a
Number of pregnancies (average \pm SD)	2.53 \pm 1.91	2.32 \pm 2.01	2.69 \pm 1.83	2.53 \pm 1.26	0.31 ^a

LSIL low squamous intraepithelial lesion, HSIL high squamous intraepithelial lesion

^a p value, t student

^b Two sided, from χ^2 test for trend

^c p value, two sided, from χ^2 test

respectively, and co-variables were not significant in both subgroups (data not shown).

BCL2-938C>A and BAX-248G>A gene frequency and their associations with SIL presence

The genotypes and allele distributions of *BCL2-938C>A* and *BAX-248G>A* in the SIL patients and control group are summarized in Table 2. The observed genotype frequencies of these SNPs were in agreement with Hardy–Weinberg equilibrium in the case and control groups in *BCL2* ($p = 0.6$ and 0.9 , respectively) and *BAX* ($p = 0.9$ and 0.06 , respectively). No association in genotype and allelic frequencies of *BCL2-938C>A* polymorphism was observed between SIL and control groups (Table 2), even when the SIL group was stratified into LSIL and HSIL subgroups (Table 3). No association was identified between LSIL and HSIL subgroups ($p > 0.05$), in any genetic model tested. There was no significant overall difference when the OR was adjusted for univariate model including age, ethnicity, tobacco use, age at first sexual intercourse, menarche, and number of pregnancies or in multivariate analysis. These variables did not change the risk for SIL development.

BAX-248G/G genotype was identified as a strong factor [$p < 0.001$, OR 3.50 (2.39–5.23)] for SIL development, with G allele carriers showing a 3.38-fold ($p < 0.001$)

higher risk for SIL development compared to homozygote wild-type allele carriers (Table 2). There was no significant difference overall when the OR was adjusted for univariate or multivariate analysis. When women with LSIL or HSIL were compared, there were no differences on genotypic or allelic frequencies. However, when those subgroups were compared with the control group, a strong increase in risk was identified in LSIL and in HSIL women; both GG genotype [$p < 0.001$, OR 4.15 (2.48–7.20); $p < 0.001$, OR 3.14 (1.96–5.03), respectively] and the G allele [$p < 0.001$, 3.74 (2.30–6.08); $p < 0.001$, 3.14 (2.07–4.77), respectively] were associated with risk for SIL (Table 3). These results indicate that GG genotype and G allele may influence the risk of SIL development, but not its severity. When the analysis was adjusted by ethnicity, age, menarche, age at first sexual intercourse, number of pregnancies, and tobacco use, no interference was found between the variant genotype and risk of SIL among groups.

BAX-expressing cells were present in all groups and were rarely expressed in keratinocytes in the epithelium in LSIL and control groups, but were notably decreased in the HSIL group. However, the frequency of BAX-expression was enhanced in the basal layer of the epithelium mainly in the LSIL group. BCL2-expressing cells in the epithelium and the stroma were enhanced in the HSIL group when compared with LSIL group.

Apoptosis

Table 2 Logistic regression analysis of associations between *BAX* (-248G<A) and *BCL-2* (-938C<A) polymorphisms and risk of squamous intraepithelial lesions

Polymorphisms	SIL n = 231 (%)	Control n = 283 (%)	<i>p</i>	χ^2	OR
Bcl2 (-938 C<A)^c					
CC	67 (29)	83 (29.3)	0.90 ^a	0.014	1
CA	111 (48)	132 (46.6)			1.04
AA	53 (23)	68 (24.1)			0.97
CC	67 (29)	83 (29.3)	0.94 ^b	0.01	0.98 (0.67–1.44)
AA + CA	164 (71)	200 (70.7)			
AA	53 (22.9)	68 (24.1)	0.77 ^b	0.08	0.94 (0.62–1.42)
CC + CA	178 (77.1)	215 (75.9)			
Alleles					
C	245 (53)	298 (52.6)	0.9 ^b	0.01	1.01 (0.79–1.30)
A	217 (47)	268 (47.4)			
Bax (-248G<A)^d					
GG	182 (78.8)	145 (51.2)	0.000001 ^a	44.5	1
GA	46 (19.9)	106 (37.5)			0.35
AA	3 (1.3)	32 (11.3)			0.08
GG	182 (78.8)	145 (51.2)	0.0000001 ^b	41.71	3.5 (2.39–5.23)
AA + GA	49 (21.2)	138 (48.8)			
AA	3 (1.3)	32 (11.3)	0.000001 ^b	20.08	0.1 (0.03–0.34)
GG + GA	228 (98.7)	251 (88.7)			
Alleles					
G	410 (88.7)	396 (69.9)	0.00000001 ^b	52.98	3.38 (2.41–4.75)
A	52 (11.3)	170 (30.1)			

SIL squamous intraepithelial lesion, OR odds ratio

^a *p* value, two sided, from χ^2 test for trend

^b *p* value, two sided, from χ^2 test

^c *BCL2* Hardy–Weinberg equilibrium (*p* = 0.43 for SIL and *p* = 0.27 for control)

^d *BAX* Hardy–Weinberg equilibrium (*p* = 0.96 for SIL and *p* = 0.07 for control)

Functional *BCL2* and *BAX* expression and SNPs association

BCL2-938C>A and *BAX*-248G>A SNPs were both reported to be associated with reduced *BCL2* and *BAX* protein expression in cancer [14–18]. To our knowledge there is no previous report relating those SNPs and their protein and mRNA expression to SIL. Here, sixty-six samples were selected, based on the availability of cervical tissue to analyze the association of genotype frequencies and both protein and mRNA expression.

BCL-2-expressing intralesional inflammatory cells were not influenced by the any of these genotypes. However, *BCL2*-938C/A and A/A homozygotes had higher distribution of *BCL-2*-expressing cells, only in the cervical stroma area in the SIL group, compared with control group (*p* = 0.044, Fig. 1a, c). *BCL2*-expressing cells had a morphology consistent with that of inflammatory and fibroblast cells (Fig. 1a). *BCL2* mRNA-expression was not correlated with *BCL2*-938C>A SNPs in either group

(Fig. 1e). These results suggest that the increased *BCL2* expressing-cells seen in SIL patients inhibit apoptosis and activate the release of pro-angiogenic factors, which are crucial for carcinogenic process.

In *BAX*-248G/A and in A/A homozygote carriers, fewer *BAX*-expressing cells were identified in the intralesional epithelium area in SIL group than in the control group (*p* = 0.002, Fig. 1b, d). However, *BAX* mRNA expression was more pronounced found in those SIL patients than in the control group (*p* = 0.0039, Fig. 1f), suggesting that HPV infection might influence the *BAX* protein down-regulation and it is genetically correlated, since there was no difference in *BAX* G/G homozygotes carriers.

Discussion

In this case–control study, we assessed the effects of *BAX*-248G>A and *BCL2*-938C>A polymorphisms on risk of cervical intraepithelial lesions. It is now well known that

Table 3 Logistic regression analysis of associations between *BAX* (-248G<A) and *BCL-2* (-838C<A) polymorphisms and risk of squamous intraepithelial lesions

SIL (n = 231)										
	LSIL n = 101(%)	Control n = 283 (%)	P	χ^2	OR	HSIL n = 129(%)	Control n = 283 (%)	P	χ^2	OR
Bcl2										
CC	27 (26.4)	83 (29.3)	0.51 ^a	0.44	1	40 (31)	83 (29.3)	0.36 ^a	0.8	1
CA	47 (46.15)	132 (46.6)			1.09	64 (49.6)	132 (46.6)			1.01
AA	28 (27.5)	68 (24.1)			1.27	25 (19.4)	68 (24.1)			0.76
CC	27 (26.4)	83 (29.3)	0.58 ^b	0.30	0.86 (0.52–1.44)	40 (31)	83 (29.3)	0.73 ^b	0.12	1.08 (0.69–1.70)
CA + AA	75 (73.6)	200 (70.7)				89 (69)	200 (70.7)			
AA	28 (27.5)	68 (24.1)	0.49 ^b	0.47	1.19 (0.71–2.00)	25 (19.4)	68 (24.1)	0.29 ^b	1.1	0.76 (0.45–1.27)
CC + CA	74 (72.5)	215 (75.9)				104 (80.6)	215 (75.9)			
Alleles										
C	101 (49.5)	298 (51.1)	0.44 ^b	0.59	0.88 (0.64–1.21)	144 (55.8)	298 (51.1)	0.39 ^b	0.71	1.13 (0.84–1.52)
A	103 (50.5)	268 (48.9)				114 (44.2)	268 (48.9)			
Bax										
GG	83 (81.4)	145 (51.2)	0.000001 ^a	23.75	1	99 (76.7)	145 (51.2)	0.000001 ^a	28.88	1
GA	17 (16.7)	106 (37.5)			0.28	29 (22.5)	106 (37.5)			0.4
AA	2 (1.9)	32 (11.3)			0.16	1 (0.8)	32 (11.3)			0.05
GG	83 (81.4)	145 (51.2)	0.000001 ^b	28.20	4.15 (2.48–7.20)	99 (76.7)	145 (51.2)	0.00000001 ^b	23.87	3.14 (1.96–5.03)
GA + AA	19 (18.6)	138 (48.8)				30 (23.3)	138 (48.8)			
AA	2 (2.0)	32 (11.3)	0.004 ^b	8.13	0.15 (0.04–6.67)	1 (0.8)	32 (11.3)	0.0002 ^b	13.34	0.06 (0.003–0.33)
GG + GA	100 (98)	251 (88.7)				128 (99.2)	251 (88.7)			
Alleles										
G	183 (89.7)	396 (69.9)	0.00000001 ^b	32.62	3.74 (2.30–6.08)	227 (88)	396 (69.9)	0.00000001 ^b	32.6	3.14 (2.07–4.77)
A	21 (10.3)	170 (30.1)				31 (12)	170 (30.1)			

SIL squamous intraepithelial lesion, LSIL and HSIL low and high squamous intraepithelial lesion, OR odds ratio

^a P value, two sided, from χ^2 test for trend^b P value, two sided, from χ^2 test

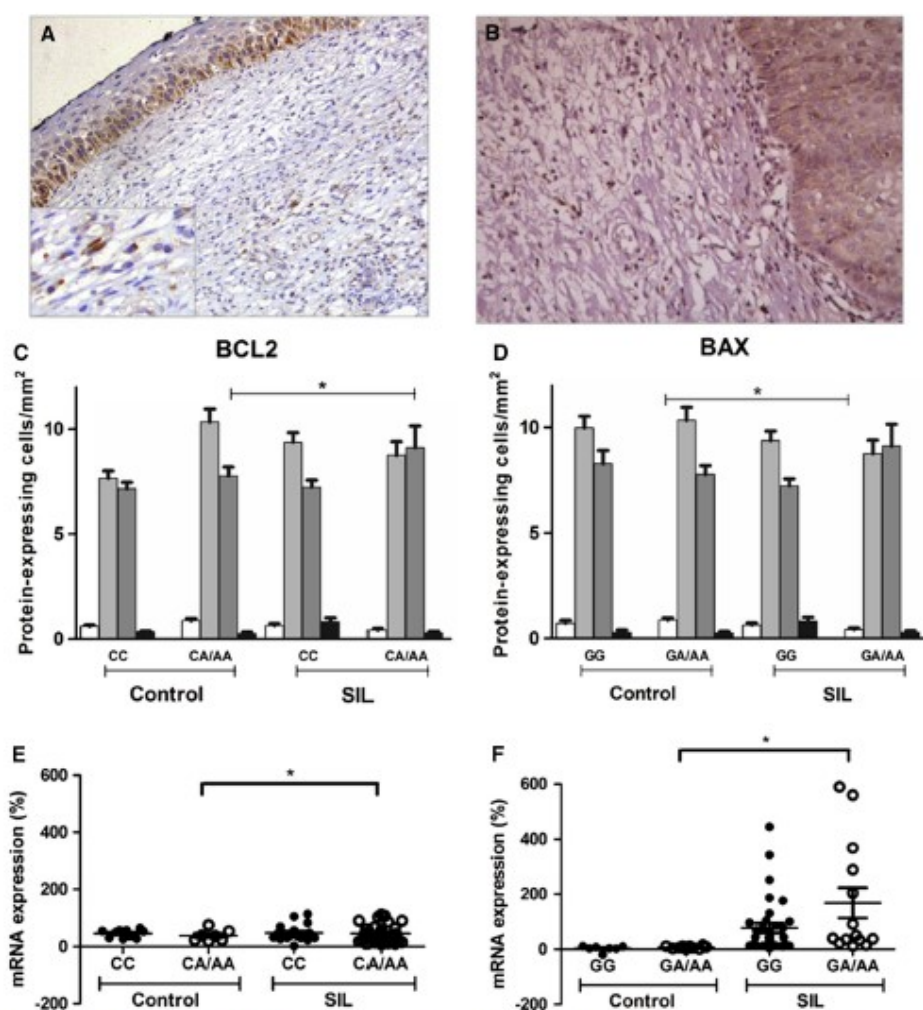


Fig. 1 Distribution of BCL2 (a, c) and BAX (b, d) expressing cells in uterine cervix from squamous intraepithelial lesions (SIL) and control groups carrying *BCL2*-938C>A or *BAX*-248G>A polymorphism was detected by immunohistochemistry in epithelium (white bars), basal

layer of epithelium (light gray bars), stroma (dark gray bars) and perivascular area (black bars); and by mRNA expression (e, f). Images in a (200 \times , inset 400 \times) and b (200 \times) are representative from patients with SIL

both neoplastic events and cancer initiation are influenced by genetic background. Control of cell proliferation is achieved by balance between the regulation of apoptosis and cell cycle genes.

When social and environmental data were analyzed, no significant association was found between SIL and control groups in all co-variables described, except in tobacco use. The effects of smoking have been examined in many case-control studies, and tobacco smoking has been seen to increase the risk of developing HSIL and cervical

cancer [23]. Nicotine and its major metabolite (cotinine) were increased 4- and 40-fold in the cervical mucus of healthy female smokers and women with CIN, respectively [24]. Moreover, DNA repair defects related to carcinogenesis and DNA damage were found in the cervical tissue of smokers. Benzo[a]pyrene (BaP), identified as a prime carcinogen in cigarette smoke, was detected in cervical tissue, and DNA adducts were present in smokers twice as often as in noncurrent smokers. Further, cell growth and DNA damage induced by BaP were higher in

HPV-16 immortalized cervical cells than in normal tissue [25].

BCL2 was initially identified as an anti-apoptotic regulatory protein [26], but it also serves as an inhibitor of proliferation [27]. The functional implication of BCL2 in tumorigenesis is ambiguous, as the anti-apoptotic effect may be oncogenic while the anti-proliferative effect appears tumor-suppressive. Which of the dual functions predominates seems to be tissue specific. This may explain why the prognostic implication of BCL2 expression depends on cancer type. In a previous study [21], we evaluated the presence of BCL2 and BAX-expressing cells in cervical lesions, according to the degree of lesions, and BCL2 expression was observed mainly in HSIL women when compared with LSIL and control groups, favoring carcinogenesis. In accordance, BCL2 expression was associated with decreased survival in leukemia and prostate cancer [28, 29], whereas in colorectal [30, 31] and breast cancer, it was related to favorable outcome.

Moreover, the association of BCL2 polymorphisms to cancer and other diseases is still controversial. In this study, the single-locus analysis for *BCL2*-938C>A polymorphism did not reveal any significant association with SIL development. No study has been reported regarding the association of *BCL2* polymorphism with SIL, cervical cancer or HPV infection. Kuhlmann et al. [32] and Chen et al. [20] did not identify any association between *BCL2*-938C>A polymorphism and risk of multiple sclerosis or squamous cell carcinoma of the head and neck. Nevertheless, the *BCL2*-938A/A genotype has been associated with increased BCL-2 expression and identified as a novel unfavorable genetic marker in patients with B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) and lung cancer [10, 33]. Hirata et al. [34] observed that *BCL2*-938C/C carriers showed higher biochemical recurrence in prostate cancer than -938C/A and A/A genotypes carriers. Additionally, in oropharyngeal squamous cell carcinoma, the *BCL2*-938C/A genotype was associated with relapse and survival [11].

The functional *BCL2*-938 C>A promoter polymorphism is located in the inhibitory P2 promoter region. C and A alleles differentially bind transcription factors and affect promoter activity. The C allele shows altered binding of transcription factors, increased activity of inhibitory promoter P2 and therefore decreased expression of BCL2 [35]. In this study, we evaluated the possible correlations between BCL2 polymorphism and its phenotypical expression (protein and mRNA) in SIL patients. A prior publication [12] demonstrated that significantly higher BCL2 mRNA expression in prostate carcinoma patients harboring the AA genotype. However, this study did not quantify BCL2 expressing cells or determine their distribution in cancer tissue. Our study is the first to identify the correlation between BCL2 protein and mRNA expression in

cervical lesions. A higher distribution of BCL2-expressing cells was observed, only in C/A + A/A genotypes carriers, in cervical stroma, when SIL patients were compared with control subjects, without association with mRNA expression. Two possible explanations may justify this discrepancy. First, the mRNA expression was performed in whole cervical tissue homogenates and not specifically in stroma. Additionally, a high concentration of a particular protein does not necessarily mean that the corresponding gene is being highly expressed at the moment of measurement. Second, the epigenetic DNA-modification induced by methylation still not clearly defined in cervical lesions induced by HPV-infection. Epigenetic gene silencing via dense DNA methylation within CpG islands has been demonstrated in HPV-associated cervical cancer. Tumor suppressor genes (TSGs), that have an important role in the pathogenesis of cervical cancer, are common targets for gene silencing in this disease [36]. The identification of a panel of aberrantly methylated TSGs represent a wide spectrum of tumor suppressive functions, as cell signaling, gene transcription, cell cycle, apoptosis, and cell adhesion, and has great promise to provide a powerful set of DNA methylation biomarkers for use in disease diagnosis and/or prognosis [37]. To clarify this inconclusive association, other studies may be addressed to correlate the higher BCL2 expression in cervical stroma area instead in the epithelial area where HPV infection occurs, including the role of methylation in BCL2 gene.

BAX is a pro-apoptotic protein and controls apoptosis by regulating mitochondrial outer membrane permeabilization [38]. Increased BAX expression may contribute to better prognosis to apoptosis in several cancers, such as hepatocellular carcinoma [39], colorectal cancer [40] and nasopharyngeal carcinoma [41]. In cervical cancer, it is still controversial. One study showed no prognostic significance [42] and two showed a negative correlation [43]. In a previous study from our group [21], we observed decreased BAX expression in HSIL, compared with LSIL and control groups, suggesting that this protein has a pivotal role in the carcinogenic process.

In relation to *BAX*-238G>A polymorphism, we identified a strong association ($p < 0.001$) between GG genotype and G allele with a risk for SIL development. There is no study in the literature correlating *BAX*-248G>A polymorphism and development of SIL or cervical cancer. However, its role in cancer is controversial. The G allele of this SNP has the same profile in lung cancer [44]. On the other hand, *BAX*-248A/A genotype was related to cancer progression and failure to achieve complete response to therapy in B-CLL [15] and squamous cell carcinoma of the head and neck [45].

The functional study comparing the *BAX*-248G>A genotypes with the phenotypic profile (protein and mRNA)

showed an evident BAX mRNA, and a decreased expression of BAX protein, in SIL patients carrying *BAX*-238 G/G and G/A genotypes. These results may suggest that HPV can inhibit the BAX protein expression in cervical lesion as reported by others. Oh et al. [46] demonstrated that HPV-E5 decreased BAX expression through the stimulation of protein degradation by an ubiquitin-proteasome-dependent pathway without decreased mRNA levels. Besides, Li et al. [47] observed that the levels of the microRNA miR-886-5p were overexpressed in human cervical squamous cell carcinoma (CSCC) cell lines, SiHa, and lowered BAX expression knockdown of this miRNA increased BAX protein and apoptotic cell death in cells of the CSCC. Additionally, HPV infection has been reported to play an anti-apoptotic role by the inhibition of BAX activity post-transcriptionally, which is caused by the stimulation of p53 degradation [48].

In conclusion, our data from a relatively large case-control study provides evidence that G allele carriers in the promoter regions of *BAX*-248G>A is related to risk of SIL development, but not to the disease severity. Additionally, we suggest a possible role for HPV infection in BAX protein expression inhibition, decreasing cell death, and favoring cervical carcinogenesis.

Acknowledgments Funding from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, 170485/2006) and Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ATGF received fellowship from CAPES, Brazil.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict interest.

References

- World Health Organization. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer in 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>. 22 Oct 2014
- Castellsague X, Sanjose S, Aguado T, Louie KS, Bruni L, Munoz J, Diaz M, Rwin K, Gacic M, Beauvais O, Albero G, Ferrer E, Byrne S, Bosch FX (2007) HPV and cervical cancer in the world. 2007 report. WHO/ICO information centre on HPV and cervical cancer (HPV information centre). *Vaccine* 25:C110. doi:10.1016/S0264-410X(07)01183-8
- Rosty C, Sheffer M, Tsafir D, Stransky N, Tsafir I, Peter M, de Crémoux P, de La Rochefordière A, Salmon R, Dorval T, Thiery JP, Couturier J, Radvanyi F, Domany E, Sastre-Garau X (2005) Identification of a proliferation gene cluster associated with HPV E6/E7 expression level and viral DNA load in invasive cervical carcinoma. *Oncogene* 24:7094–7104. doi:10.1038/sj.onc.1208854
- Martin CM, Astbury K, O'Leary JJ (2006) Molecular profiling of cervical neoplasia. *Expert Rev Mol Diagn* 6:217–229. doi:10.1586/14737159.6.2.217
- Minkoff H, Feldman JG, Strickler HD, Watts DH, Bacon MC, Levine A, Palefsky JM, Burk R, Cohen MH, Anastos K (2004) Relationship between smoking and human papillomavirus infections in HIV-infected and -uninfected women. *J Infect Dis* 189:1821–1828. doi:10.1086/383479
- Cory S, Adams JM (2002) The BCL2 family: regulators of the cellular life-or deathswitch. *Nat Rev Cancer* 2:647–656. doi:10.1038/nrc883
- Kim HJ, Jang SI, Kim YI, Pae HO, Won HY, Hong KH, Oh H, Kwon TO, Chung HT (2004) 4-Acetyl-12,13-epoxy-9-trichothecene-3, 15-diol from *Isaria japonica* mediates apoptosis of rat bladder carcinoma NBT-II cells by decreasing anti-apoptotic Bcl-2 expression and increasing proapoptotic Bax expression. *Am J Chin Med* 32:377–387. doi:10.1142/S0192415X0400203X
- Filippova M, Parkhurst L, Duerksen-Hughes PJ (2004) The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem* 279:25729–25744. doi:10.1074/jbc.M401172200
- Yuan H, Fu F, Zhuo J, Wang W, Nishitani J, An DS, Chen IS, Liu X (2005) Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins upregulate c-IAP2 gene expression and confer resistance to apoptosis. *Oncogene* 24:5069–5078. doi:10.1038/sj.onc.1208691
- Nüchel H, Frey UH, Bau M, Sellmann L, Stanelle J, Dürig J, Jöckel KH, Dührsen U, Siffert W (2007) Association of a novel regulatory polymorphism (-938C>A) in the BCL2 gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109:290–297. doi:10.1182/blood-2006-03-007567
- Leherdt GF, Franz P, Bankfalvi A, Grehl S, Kelava A, Nüchel H, Lang S, Schmid KW, Siffert W, Bachmann HS (2009) The regulatory BCL2 promoter polymorphism (-938C>A) is associated with relapse and survival of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Ann Oncol* 20:1094–1099. doi:10.1093/annonc/mdn763
- Bachmann HS, Heukamp LC, Schmitz KJ, Hilburn CF, Kahl P, Buettner R, Nüchel H, Eisenhardt A, Rübber H, Schmid KW, Siffert W, Eggert A, Schramm A, Schulte JH (2011) Regulatory BCL2 promoter polymorphism (-938C>A) is associated with adverse outcome in patients with prostate carcinoma. *Int J Cancer* 129:2390–2399. doi:10.1002/ijc.25904
- Heubner M, Wimberger P, Otterbach F, Kasimir-Bauer S, Siffert W, Kimmig R, Nüchel H (2009) Association of the AA genotype of the BCL2 (-938C>A) promoter polymorphism with better survival in ovarian cancer. *Int J Biol Markers* 24:223–229
- Ocaña MG, Valle-Garay E, Montes AH, Meana A, Cartón JA, Frier J, Celada A, Asensi V (2007) Bax gene G(-248)A promoter polymorphism is associated with increased lifespan of the neutrophils of patients with osteomyelitis. *Genet Med* 9:249–255
- Saxena A, Moshynska O, Sankaran K, Viswanathan S, Sheridan DP (2002) Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5'-UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. *Cancer Lett* 187:199–205. doi:10.1016/S0304-3835(02)00378-6
- Fegan C, Starczynski J, Pratt G, Pepper C (2006) The role of the bax gene polymorphism G(-248)A in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 20:1460–1461. doi:10.1038/sj.leu.2404280
- Nüchel H, Frey UH, Sellmann L, Bau M, Dürig J, Dührsen U, Siffert W (2006) Bax gene G(-248)A promoter polymorphism and chronic lymphocytic leukemia: lack of association with incidence, disease stage and progression-free survival. *Leukemia* 20:724. doi:10.1038/sj.leu.2404126
- Skogsberg S, Tobin G, Kröber A, Kienle D, Thunberg U, Aleskog A, Karlsson K, Laurell A, Merup M, Vilpo J, Sundström C, Roos G, Jernberg-Wiklund H, Döhner H, Nilsson K, Stålgren S, Rosenquist R (2006) The G(-248)A polymorphism in the promoter region of the Bax gene does not correlate with prognostic

- markers or overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 20:77–81. doi:10.1038/sj.leu.2404030
19. de Andrade AC, Luz PM, Velasque L, Veloso VG, Moreira RJ, Russomano F, Chicarino-Coelho J, Pires E, Levi JE, Grinsztajn B, Friedman RK (2011) Factors associated with colposcopy-histopathology confirmed cervical intraepithelial neoplasia among hiv-infected women from Rio De Janeiro, Brazil. *PLoS One* 6:1–6. doi:10.1371/journal.pone.0018297
 20. Chen K, Hu Z, Wang LE, Sturgis EM, El-Naggar AK, Zhang W, Wei Q (2007) Single-nucleotide polymorphisms at the TP53-binding or responsive promoter regions of BAX and BCL2 genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 28:2008–2012. doi:10.1093/carcin/bgm172
 21. Fernandes AT, da Rocha NP, Avvad E, Grinsztajn BJ, Russomano F, Tristão A, Quintana Mde S, Perez MA, Conceição-Silva F, da Bonecini-Almeida MG (2013) Balance of apoptotic and anti-apoptotic marker and perforin granule release in squamous intraepithelial lesions. HIV infection leads to a decrease in perforin degranulation. *Exp Mol Pathol* 95:166–173. doi:10.1016/j.yexmp.2013.06.006
 22. Knudsen BS, Allen AN, McLerran DF, Vessella RL, Karademos J, Davies JE, Maqsoodi B, McMaster GK, Kristal AR (2008) Evaluation of the branched-chain DNA assay for measurement of RNA in formalin-fixed tissues. *J Mol Diagn* 10:169–176. doi:10.2353/jmoldx.2008.070127
 23. Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX (2002) Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359:1093–1101. doi:10.1016/S0140-6736(02)08151-5
 24. Hellberg D, Nilsson S, Haley NJ, Hoffman D, Wynder E (1988) Smoking and cervical intraepithelial neoplasia: nicotine and cotinine in serum and cervical mucus in smokers and nonsmokers. *Am J Obstet Gynecol* 158:910–913. doi:10.1016/0002-9378(88)90093-2
 25. Melikian AA, Sun P, Prokopczyk B, El-Bayoumy K, Hoffmann D, Wang X, Waggoner S (1999) Identification of benzo[a]pyrene metabolites in cervical mucus and DNA adducts in cervical tissues in humans by gas chromatography-mass spectrometry. *Cancer Lett* 146:127–134. doi:10.1016/S0304-3835(99)00203-7
 26. Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2:647–656. doi:10.1038/nrc883
 27. Zinkel S, Gross A, Yang E (2006) BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ* 13:1351–1359. doi:10.1038/sj.cdd.4401987
 28. Mehta SV, Shukla SN, Vora HH (2013) Overexpression of Bcl2 protein predicts chemoresistance in acute myeloid leukemia: its correlation with FLT3. *Neoplasma* 60:6666–6759. doi:10.4149/neo_2013_085
 29. Fonseca GN, Srougi M, Leite KR, Nesrallah LJ, Ortiz V (2004) The role of HER2/neu, BCL2, p53 genes and proliferating cell nuclear protein as molecular prognostic parameters in localized prostate carcinoma. *Sao Paulo Med J* 122:124–127. doi:10.1590/S1516-31802004000300009
 30. Noble P, Vyas M, Al-Attar A, Durrant S, Scholefield J, Durrant L (2013) High levels of cleaved caspase-3 in colorectal tumour stroma predict good survival. *Br J Cancer* 108:2097–2105. doi:10.1038/bjc.2013.166
 31. Bozovic-Spasojevic I, Amey L, Paesmans M, Larisimont D, Di Leo A, Dolci S, Piccart M, de Azambuja E, Loi S (2014) Prognostic, predictive abilities and concordance of BCL2 and TP53 protein expression in primary breast cancers and axillary lymph nodes: a retrospective analysis of the Belgian three arm study evaluating anthracycline vs CMF adjuvant chemotherapy. *Breast* 23:473–481. doi:10.1016/j.breast.2014.03.012
 32. Kuhlmann T, Glas M, zum Bruch C, Mueller W, Weber A, Zipp F, Brück W (2002) Investigation of bax, bcl-2, bcl-x and p53 gene polymorphisms in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 129:154–160. doi:10.1016/S0165-5728(02)00167-4
 33. Masago K, Togashi Y, Fujita S, Nagai H, Sakamori Y, Okuda C, Kim YH, Mishima M (2013) Effect of the BCL2 gene polymorphism on survival in advanced-stage non-small cell lung cancer patients who received chemotherapy. *Oncology* 84: 214–218. doi:10.1159/000342854
 34. Hirata H, Hinoda Y, Kikuno N, Suehiro Y, Shahryari V, Ahmad AE, Tabatabai ZL, Igawa M, Dahiya R (2009) BCL2 -938C>A polymorphism carries increased risk of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *J Urol* 181:1907–1912. doi:10.1016/j.juro.2008.11.093
 35. Young RL, Korsmeyer SJ (1993) A negative regulatory element in the bcl-2 5'-untranslated region inhibits expression from an upstream promoter. *Mol Cell Biol* 13:3686–3697
 36. Wentzensen N, Sherman ME, Schiffman M, Wang SS (2009) Utility of methylation markers in cervical cancer early detection: appraisal of the state-of-the-science. *Gynecol Oncol* 112:293–299. doi:10.1016/j.ygyno.2008.10.012
 37. Lorincz AT (2011) The promise and the problems of epigenetics biomarkers in cancer. *Expert Opin Med Diagn* 5:375–379. doi:10.1517/17530059.2011.590129
 38. Antignani A, Youle RJ (2006) How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr Opin Cell Biol* 18:685–689. doi:10.1016/j.cob.2006.10.004
 39. Qiu DM, Wang GL, Chen L, Xu YY, He S, Cao XL, Qin J, Zhou JM, Zhang YX, Qun E (2014) The expression of beclin-1, an autophagic gene, in hepatocellular carcinoma associated with clinical pathological and prognostic significance. *BMC Cancer* 14:327. doi:10.1186/1471-2407-14-327
 40. Ko YH, Cho YS, Won HS, An HJ, Sun DS, Hong SU, Park JH, Lee MA (2013) Stage-stratified analysis of prognostic significance of Bax-interacting factor-1 expression in resected colorectal cancer. *Biomed Res Int* 2013:1–8. doi:10.1155/2013/329839
 41. Kontos CK, Fendri A, Khabir A, Mokdad-Gargouri R, Scorilas A (2013) Quantitative expression analysis and prognostic significance of the BCL2-associated X gene in nasopharyngeal carcinoma: a retrospective cohort study. *BMC Cancer* 13:293. doi:10.1186/1471-2407-13-293
 42. Tjalma WA, Weyler JJ, Bogers JJ, Pollefliet C, Baay M, Goovaerts GC, Vermorken JB, van Dam PA, van Marck EA, Buytaert PM (2001) The importance of biological factors (bcl-2, bax, p53, PCNA, MI, HPV and angiogenesis) in invasive cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 97:223–230. doi:10.1016/S0301-2115(00)00541-8
 43. Chung TK, Cheung TH, Lo WK, Yim SF, Yu MY, Krajewski S, Reed JC, Wong YF (2002) Expression of apoptotic regulators and their significance in cervical cancer. *Cancer Lett* 180:63–68. doi:10.1016/S0304-3835(01)00842-4
 44. Yu DK, Guo YL, Tan W, Lin DX (2010) Functional Bax polymorphism associated with lung cancer susceptibility. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 32:324–327
 45. Chen K, Hu Z, Wang LE, Sturgis EM, El-Naggar AK, Zhang W, Wei Q (2007) Single-nucleotide polymorphisms at the TP53-binding or responsive promoter regions of BAX and BCL2 genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 28:2008–2012. doi:10.1093/carcin/bgm172
 46. Oh JM, Kim SH, Cho EA, Song YS, Kim WH, Juhn YS (2010) Human papillomavirus type 16 E5 protein inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cancer cells. *Carcinogenesis* 31:402–410. doi:10.1093/carcin/bgp318

11.3 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisas

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Identificação de marcadores de prognóstico através da modulação da expressão de metaloproteinases e sua participação na carcinogênese cervical

Pesquisador: Maria da Glória Bonecini de Almeida

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 35589314.0.0000.5262

Instituição Proponente: INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI/FIOCRUZ

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.541.577

Apresentação do Projeto:

Trata-se de Emenda ao projeto aprovado por este CEP – Parecer 951.235, datado de 11/02/2015.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar marcadores prognósticos associados à carcinogênese cervical em relação à expressão e modulação de metaloproteinases (MMPs) por citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2), ephrin e EphA2.

Objetivo Secundário:

- Identificar e associar a expressão fenotípica das MMPs 2, 7 e 9 e de seu inibidor TIMP-2, ephrin e do receptor EphA2, NOS2 e TNF- nas lesões de colo uterino como marcadores de carcinogênese.
- Identificar e associar a expressão de PGE2 nas lesões de colo uterino como marcadores de carcinogênese.- Avaliar a modulação das MMPs, EphA2, ephrin e PGE2 por TNF-, IL-6, IL-8, IL-17 e NOS2 in vitro em linhagens de queratinócitos cervicais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Permanecem os mesmos descritos no Parecer 951.235.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esta Emenda tem como objetivo a inclusão de um novo centro colaborador, ou seja, o Instituto de

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 1.541.577

Ginecologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, autorizando a coleta de material (fragmentos de biopsia do colo uterino), de pacientes atendidos no Ambulatório de Patologia Cervical e Colposcopia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentada uma Carta de Anuência do Instituto de Ginecologia - UFRJ, datada de 20 de abril de 2016, assinada pelo seu Diretor, Prof. Dr. Gutemberg Leão de Almeida Filho.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências e nem inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

É necessária a aprovação do projeto pelo CEP do Instituto de Ginecologia da UFRJ, que no caso é coparticipante.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_704785 E1.pdf	26/04/2016 12:29:30		Aceito
Outros	Carta_Anuencia.pdf	26/04/2016 12:20:12	Maria da Glória Bonecini de Almeida	Aceito
Outros	TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE.doc	03/02/2015 15:29:14		Aceito
Outros	Regulamento de Biorepositório.pdf	03/02/2015 15:28:50		Aceito
Outros	Memorando CEP escaneado.pdf	03/02/2015 15:28:26		Aceito
Outros	Declaração de submissão ao CEP- CONEP.pdf	03/02/2015 15:27:55		Aceito
Outros	Anuência da execução - IFF.pdf	03/02/2015 15:27:15		Aceito
Outros	PROJETO CEP - versão 2015.docx	03/02/2015 15:26:20		Aceito
Outros	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - GRUPO CONTROLE - versão 2015.doc	03/02/2015 15:25:55		Aceito
Outros	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - CASOS - versão	03/02/2015 15:25:34		Aceito

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 1.541.577

Outros	2015.docx	03/02/2015 15:25:34		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO CEP.docx	03/09/2014 13:37:36		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto_.pdf	02/09/2014 13:42:20		Aceito
Outros	QUESTIONÁRIO.docx	04/08/2014 15:52:05		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).docx	04/08/2014 15:50:56		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 12 de Maio de 2016

Léa Ferreira Camillo-Coura

Assinado por:
Léa Ferreira Camillo-Coura
(Coordenador)

Dr.^a Léa Ferreira Camillo-Coura
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
Mat. SIAPE 003709620
IPEC / FIOCRUZ

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

11.4 Carta de Anuência IG/UFRJ



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE GINECOLOGIA

CARTA DE ANUÊNCIA

Eu, **Gutemberg Leão de Almeida Filho**, diretor do Instituto de Ginecologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, estou ciente e autorizo a coleta de material (fragmento de biopsia do colo uterino), de pacientes atendidas no Ambulatório de Patologia Cervical e Colposcopia, para serem utilizadas na Tese "*IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES DE PROGNÓSTICO ATRAVÉS DA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES E SUA PARTICIPAÇÃO NA CARCINOGENESE CERVICAL*." da aluna Natália Pereira da Rocha do Curso de Doutorado de Pesquisa Aplicada na Saúde da Criança e da Mulher do Instituto Fernandes Figueira.

Rio de Janeiro, 20 de Abril de 2016.

Prof. Dr. Gutemberg Leão de Almeida Filho
Diretor
Instituto de Ginecologia - UFRJ

 Gutemberg L. de Almeida Filho
Diretor do Instituto de Ginecologia - UFRJ
Reg. 0122406 Sub. L. 1051