

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS
MESTRADO INTERINSTITUCIONAL UFRGS-UPF

ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE INTEGRINA
ALFA(V) BETA(3) EM LESÕES MALIGNAS E PRÉ-MALIGNAS
DE COLO UTERINO

Lieverson Augusto Guerra

Orientadora: Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss

Co-orientadora: Dra. Daniela Dornelles Rosa

Dissertação de Mestrado

2010

LIEVERSON AUGUSTO GUERRA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE INTEGRINA
ALFA(V) BETA(3) EM LESÕES MALIGNAS E PRÉ-MALIGNAS
DE COLO UTERINO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do Título de Mestre em Medicina, sob orientação da Prof^a Dra Maria Isabel Albano Edelweiss.

2010

AGRADECIMENTOS

- À UFRGS e a UPF, pela oportunidade realização do curso.
- À Professora orientadora Dra. Maria Isabel Edelweiss e a co-orientadora Dra Daniela Dornelles da Rosa, pela orientação, apoio incondicional, compreensão, estímulo e incentivo na pesquisa. Tornaram possível este projeto. Incansavelmente, durante esses anos, foram exemplo de conhecimento, orientação, dedicação e amizade. Minha gratidão por vocês; vossa ajuda, me fez um ser humano melhor.
- À Professora Dra. Daniela Augustin Silveira, pela participação, incentivo e dedicação de seu precioso tempo para a construção deste.
- À Dra. Sandra Fuchs e Dr Hugo Lisboa, pelo apoio, compreensão e essencial estímulo, que pela percepção humana, contribuíram nos momentos de angústia.
- À minha colega, Erimara Dall Agnol, pela ajuda e apoio.
- À funcionaria Vicentina, do Registro Hospitalar de Câncer do HSVP, pela colaboração e carinho com que tem responsabilidade sobre os dados dos pacientes, durante todos esses anos em que trabalhamos juntos.
- Aos médicos do Instituto de Patologia de Passo Fundo, em especial a Professora Dra Ana Marcolan, pelo apoio ao projeto.
- Aos técnicos de laboratório do Serviço de Patologia do HSVP e do Instituto de Patologia de Passo Fundo, pela disposição, auxílio, empenho e participação durante a coleta dos dados e desenvolvimento laboratorial do projeto.
- Ao corpo editorial do *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, em especial ao Editor Chefe Mauro Castelli, pela fundamental colaboração.
- Aos meus colegas oncologistas do Centro de Oncologia e Hematologia do Planalto e do Hospital São Vicente de Paulo da Universidade de Passo Fundo, pelo apoio, incentivo e compreensão.

Dedico este trabalho ao meu pai. Pelo pequeno tempo em que convivemos.
Em minha memória, sempre a lembrança de felicidade e honestidade, que marcaram minha
infância.

Seu caráter, norteou minhas atitudes e fez de mim uma pessoa melhor.

Minha mãe Zaida, que com méritos conduziu minha infância ate a Universidade. Fez de mim
um homem.

Minha querida esposa Janaina, pelo amor, paciência, estímulo e compreensão das horas em
que me privei da sua companhia, para atuar na construção da pesquisa.

Meus filhos Guilherme e Luiz Augusto, pela lúdica compreensão de minha ausência.

RESUMO

Introdução: O câncer do colo uterino apresenta alta prevalência no Brasil, representando 10% de todas as neoplasias malignas nas mulheres. Estima-se para o ano de 2010, 18.430 novos casos de câncer de colo do útero no Brasil. Em um elevado número de mulheres com doença localmente avançada, a neoplasia recorre após o tratamento inicial com quimio-radioterapia e, poucas opções terapêuticas estão disponíveis neste cenário. Entretanto, faz-se necessário o estudo de novos alvos terapêuticos, assim como novos fatores prognósticos para o câncer de colo uterino. Estudos pré-clínicos demonstraram que a expressão de diversas integrinas estão associadas com a invasão celular, angiogênese e carcinogênese.

Objetivos: Avaliar a expressão imunohistoquímica da integrina alfa(v) beta(3) ($\alpha_v \beta_3$) em lesões malignas e pré-malignas de colo uterino e correlacionar os achados com o desfecho das pacientes.

Métodos: Realizou-se um estudo de coorte retrospectivo não controlado. Foram revisados os laudos anatomopatológicos do Serviço de Patologia do Hospital São Vicente de Paulo da Universidade de Passo Fundo e do Instituto de Patologia de Passo Fundo, com diagnóstico de neoplasia de colo uterino, no período entre novembro de 2001 a novembro de 2008, em um total de 162 amostras, de 150 pacientes. A análise da expressão foi realizada através de estudo imunohistoquímica, utilizando o anticorpo BV3 (monoclonal de camundongo) específico para integrina alfa v beta 3 (Abcam, Inc. Cambridge, MA), com diluição de 1:400. Os resultados foram analisados por dois patologistas independentes e categorizados como positivos ou negativos. Os dados de evolução, tratamento e sobrevida foram obtidos através de revisão de prontuários.

Resultados: Na análise de 146 pacientes, o índice de KAPPA de concordância foi de 0.808 ($p < 0.05$) e as diferenças foram resolvidas por consenso. A positividade focal foi presente em 15% dos casos, sem relação com sobrevida livre de doença ou óbito. Dentre os 22 casos positivos, 45,5% eram lesões pré-malignas e 54,5% câncer invasivo. Não houve diferença na sobrevida livre de doença para pacientes com câncer e expressão da integrina alfa(v) beta(3), comparados com os casos sem expressão.

Conclusão: Não foi observada associação entre a expressão da integrina alfa(v) beta (3) e o desfecho nas pacientes com câncer de colo uterino ou com lesões intraepiteliais do colo uterino.

Palavras-chave: câncer de colo uterino, lesões intraepiteliais do colo uterino, imunohistoquímica, integrinas, integrina alfa(v) beta(3), $\alpha_v \beta_3$, marcadores moleculares.

LISTA DE ABREVIATURAS

INCA: Instituto Nacional do Câncer
HPV: papilomavírus humano
NIC: neoplasia intraepitelial cervical
FIGO: *International Federation of Gynecology and Obstetrics*
AJCC: *American Joint Committee on Cancer*
DNA: ácido desoxirribonucléico
IgSF: superfamília das imunoglobulinas
EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico
FGFR: receptor do fator de crescimento fibroblástico
IGF-I: receptor do fator de crescimento ligado à insulina
CDH1: gene que codifica a proteína E-caderina
GTP: guanina trifosfato dependente de cálcio
kDa: kilo Daltons
VEGF: fator de crescimento endotelial vascular
TGFb: fator b de crescimento tumoral
bFGF: fator básico de crescimento fibroblástico
FAK: quinase de adesão focal
MIDAS: sitio de adesão dependente de íon metálico
RGD: tripeptídeo arginina-glicina-ácido aspártico
RTK: receptores tirosina kinases
ME: matriz extracelular
MMP-2: metaloproteases da matriz
RNA: ácido ribonucléico
LAP: peptídeo associado a latência
ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
IH: imunohistoquímica
CEM: Comissão de Ética Médica
CEP: Comitê de Ética em Pesquisa
CAAE: Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

LISTA DE ABREVIATURAS DO ARTIGO

IHC: immunohistochemistry

ECM: extracellular matrix

MMP: matrix metalloproteinases

TBS: Tris-buffered saline

BSA: Bovine serum albumin

LSAB: Labeled Streptavidin Biotin

DAB: Diaminobenzidine tetrahydrochloride

CT: Computer tomography

SPSS: Statistical Package for Social Sciences

SD: standard deviation

CAAE: Presentation Certificate of Ethics Appreciation

HE: hematoxylin and eosin

CIN: cervical intraepithelial neoplasia

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1.	45
Table 2.	46
Table 3.	46

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Photo 1.	45
Photo 2.	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1. Carcinogênese	14
2.2. Metástases	15
2.3. Matriz Extracelular	16
2.4. Angiogênese	19
2.5. Integrinas	19
2.6. Integrina alfa(v) beta(3) ($\alpha v\beta 3$)	23
2.7. Invasão celular tumoral	24
2.8. Integrinas e câncer	25
2.9. Integrinas e câncer de colo uterino	26
3. HIPÓTESE	30
4. OBJETIVOS	30
4.1. Objetivo geral	30
4.2. Objetivos específicos	30
5. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	31
6. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	38
7. CONSIDERAÇÕES GERAIS	49
8. ANEXOS	50
8.1. Classificação TNM e Estadiamento FIGO	50
8.2. Técnica de Imunohistoquímica	50
8.3. Ficha de coleta de dados	53
8.4. Considerações éticas	53

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, estima-se que seja o terceiro câncer mais comum na população feminina (após o câncer de pele não melanoma e o câncer de mama), representando 10% de todos os tumores malignos em mulheres. De acordo com estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2010, devem ocorrer 18.430 novos casos de câncer do colo do útero, com um risco estimado de 18 casos a cada 100.000 mulheres. ⁽⁰¹⁾

Nos Estados Unidos, o carcinoma de colo uterino é a segunda causa de morte entre as mulheres no grupo etário dos 20 aos 39 anos, com uma estimativa de 11.270 novos casos e de 4.070 mortes em 2009. ⁽⁰²⁾ Mundialmente, é a sétima neoplasia em frequência global e o segundo câncer mais comum entre as mulheres, com uma estimativa de 551.100 novos casos e 309.800 mortes em 2007. É muito mais comum nos países em desenvolvimento, onde 83% dos casos ocorrem, com um risco de 1,5% até os 65 anos de idade. ⁽⁰³⁾

Entre os fatores de risco para o desenvolvimento de carcinoma do colo uterino estão a presença de múltiplos parceiros sexuais e doenças sexualmente transmissíveis, o início de relações sexuais em idade precoce, parceiros promíscuos, tabagismo, imunodeficiências, deficiência de vitaminas A ou C e o uso de anticoncepcionais orais. ⁽⁰⁴⁾ Estudos moleculares e epidemiológicos têm demonstrado que a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é um fator causal de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e de carcinoma do colo uterino invasivo. ⁽⁰⁴⁾

A infecção persistente por um dos 15 genótipos do HPV carcinogênico é a responsável direta por praticamente todos os casos de neoplasia. Existem quatro etapas maiores no desenvolvimento do câncer: infecção do epitélio metaplásico na zona de transformação cervical, persistência viral, progressão do epitélio persistentemente infectado para lesões pré-malignas cervicais e, finalmente, invasão através da membrana basal do epitélio cervical. A infecção é extremamente comum em mulheres jovens na sua primeira década de atividade sexual. Infecções persistentes e lesões pré-malignas ocorrem em 5-10 anos a partir de novas infecções. O câncer invasivo ocorre após muitos anos, mesmo décadas, em uma minoria das mulheres com lesões pré-cancerígenas, com um pico ou platô de risco, em torno dos 35-55 anos de idade. Cada genótipo do HPV atua como uma infecção independente, com diferentes riscos carcinogênicos. ^(04,05)

Entre 80 a 90% das neoplasias de colo uterino são do tipo epidermóide. Geralmente, a progressão metastática segue um padrão relativamente ordenado, ocorrendo inicialmente para

os linfonodos pélvicos, destes para os para-aórticos e, então, para sítios distantes, como pulmões, linfonodos extra-pélvicos e ossos. ⁽⁰⁴⁾

O câncer de colo uterino tem seu estadiamento definido de acordo com a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) (anexo 1), tendo sua última revisão publicada em janeiro de 2009. ⁽⁰⁶⁾ Nesta neoplasia, o estadiamento é o principal fator prognóstico estabelecido. Embora as taxas de sobrevida global e controle da doença pélvica apresentem associação direta com o estadiamento da FIGO, o prognóstico também é influenciado por outros fatores não incluídos no estadiamento. ⁽⁰⁴⁾

O diâmetro clínico do tumor associa-se fortemente ao prognóstico em pacientes tratadas com radioterapia ⁽⁰⁷⁾ ou cirurgia. ⁽⁰⁸⁾ Por esta razão, a FIGO modificou a classificação do estágio I, que passou a ser subdividido de acordo com o diâmetro tumoral (menor ou igual a 4 cm ou maior que 4 cm de diâmetro). ⁽⁰⁶⁾

Em pacientes com estágios IB-IIB e invasão patológica de paramétrios, tratadas com cirurgia radical e terapia adjuvante, presença de invasão vaginal, metástases linfonodais e histologia não escamosa são indicadores independentes das taxas de sobrevida livre de doença; presença de invasão vaginal e metástases linfonodais são fatores prognósticos independentes para as taxas de sobrevida global, a qual pode chegar a 90% quando estes fatores estão ausentes. ⁽⁰⁹⁾

Para doença maligna mais avançada, outros parâmetros apresentam associação com o prognóstico, como a presença de envolvimento parametrial medial *versus* lateral, no estágio IIB, ou envolvimento unilateral ou bilateral de paramétrios ou de parede pélvica. ^(04,09)

Metástases em linfonodos são os preditores de maior importância no prognóstico. Em pacientes tratadas com histerectomia radical para estágio clínico IB, as taxas de sobrevida variam de 85 a 95% quando os linfonodos pélvicos são negativos e de 45 a 55% quando há metástases nodais presentes. Para pacientes com linfonodos para-aórticos positivos, tratadas com radioterapia, as taxas de sobrevida variam entre 10-50%, dependendo da extensão de envolvimento pélvico e para-aórtico. ⁽⁰⁴⁾

Para pacientes tratadas com histerectomia radical, outros parâmetros histológicos são associados com mau prognóstico, como a invasão de espaço linfovascular, invasão estromal profunda e extensão parametrial. O envolvimento do corpo uterino associa-se com elevada taxa de metástases à distância, em pacientes tratadas com radioterapia ou cirurgia. ⁽¹⁰⁾

Devido à prevalência elevada desta neoplasia em nosso meio, faz-se necessário o estudo de novos fatores prognósticos e potenciais alvos terapêuticos. Diversos estudos mostram que a expressão de integrinas associa-se ao potencial de invasão celular tumoral, angiogênese e carcinogênese. As integrinas estão expressas em diversas neoplasias epiteliais e desempenham importante papel na angiogênese, mas ainda não está definida sua expressão e o potencial significado de sua positividade no desfecho de pacientes com câncer de colo uterino e ou lesões intraepiteliais. Com a finalidade de avaliar a expressão desta integrina e compará-la com o desfecho clínico das pacientes, foi proposto o presente estudo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Carcinogênese

Denomina-se carcinogênese o processo pelo qual tem início a formação do câncer. Etiologicamente, os tumores são doenças celulares, onde ocorre um desvio no mecanismo de controle no processo de duplicação celular (proliferação e diferenciação). As etapas deste complexo sistema tem sido intensamente estudadas e, novos caminhos descobertos, assim como sua implicação no processo normal e anormal desta gênese. ⁽⁰⁴⁾

No núcleo celular estão presentes os cromossomos, que são compostos de genes, onde a informação genética está inscrita e arquivada através do ácido desoxirribonucléico (DNA) e, por este, os cromossomos passam as informações para o funcionamento celular. ⁽⁰⁴⁾

Uma célula normal pode sofrer alterações no DNA, processo conhecido como mutação genética. As células cujo material genético foi alterado, passam a receber instruções erradas para as suas funções. Estas alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados protooncogenes, que a princípio podem estar presentes e de forma inativa, em células normais. Quando ativados, estes protooncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis então pelo processo de transformação desta célula normal e assim, assumindo características diferenciadas. ^(04,11,12)

As alterações genéticas encontradas somente nas células neoplásicas não são capazes de explicar as múltiplas etapas envolvidas na carcinogênese, entretanto, as células tumorais são capazes de expressar diversos fenótipos durante as complexas fases de desenvolvimento tumoral e progressão. ^(11,12)

Existem etapas distintas envolvidas neste processo de transformação de uma célula normal em uma célula maligna e, didaticamente, é possível à divisão destas, em três em fases:

a. Estágio de iniciação

É o primeiro estágio da carcinogênese, quando as células sofrem o efeito dos agentes cancerígenos ou carcinógenos, que provocam modificações em alguns de seus genes. Nesta fase as células se encontram geneticamente alteradas, porém, ainda não é possível se detectar um tumor clinicamente. Encontram-se "preparadas", ou seja, iniciadas, para a ação de um segundo grupo de agentes que atuará no próximo estágio. ⁽¹¹⁻¹³⁾

Mutações em oncogenes dominantes e supressores recessivos desregulam os circuitos regulatórios que controlam o curso celular, conferindo as células neoplásicas a capacidade para sobreviverem e proliferarem, mesmo na indisponibilidade de informações definidas. ⁽¹¹⁻¹³⁾

b. Estágio de promoção

Neste segundo estágio da carcinogênese, as células geneticamente alteradas ("iniciadas"), sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário ocorrer um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. A suspensão do contato com agentes promotores muitas vezes interrompe o processo nesse estágio. Alguns componentes da alimentação e a exposição excessiva e prolongada a hormônios são exemplos de fatores que promovem a transformação de células iniciadas em malignas. ⁽¹¹⁻¹³⁾

c. Estágio de progressão

Caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Nessa terceira e última etapa, o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença. ⁽¹¹⁻¹³⁾

Os fatores que promovem a iniciação ou progressão da carcinogênese são chamados agentes oncoaceleradores ou carcinógenos. ^(04,11-13)

2.2. Metástases

As metástases são o produto final de um processo evolutivo, no qual, as diversas interações entre as células tumorais cancerosas e o microambiente, rendem alterações que permitem a essas células transcenderem a um comportamento programado. Assim, as células tumorais, povoam e florescem em novos tecidos e, em última instância, causam uma disfunção orgânica e morte. ^(12,14) Compreender a muitos eventos e processo moleculares envolvidos nas metástases, poderia conduzir a uma efetiva, abordagem orientada para a prevenção e terapia do câncer. No processo de metastatização, pelo qual as células cancerígenas deixam o tumor primário e disseminam-se, para formarem tumores em sítios anatômicos distantes, é um problema de ordem complexa, que na grande maioria das vezes, não apresentam possibilidade de tratamento ou sucesso terapêutico efetivo. As metástases resultam de uma complexa cascata molecular, compreendendo várias etapas, as quais estão

interconectadas por uma serie de interações adesivas e processos invasivos, além de respostas a estímulos quimiotáxicos, ainda não completamente conhecidos. ⁽¹⁵⁾

Os tumores primários consistem de populações heterogêneas de células com alterações genéticas, que lhes permitem superar limites físicos, disseminarem-se e colonizarem um órgão distante. As metástases são a sucessão destes processos individuais. ⁽¹²⁾ Em modelos animais, 0,01% ou menos das células cancerosas que entram na circulação se desenvolverão em metástases. ^(16,17)

A instabilidade genômica intrínseca das células cancerosas aumenta a frequência de alterações necessárias para adquirir capacidade metastática. A instabilidade genômica e a heterogeneidade das células tumorais estão evidenciadas pelos aparentes ganhos, perdas e rearranjos cromossômicos associados ao câncer. A integridade do DNA pode ser comprometida pela progressão aberrante no ciclo celular, disfunção telomérica caracterizada por anomalia genética e instabilidade cromossômica, inativação de genes do reparo do DNA e, mecanismos epigenéticos de controle alterados. ^(18,19) Em cerca de 50% dos tumores há perda da proteína de supressão tumoral p53, que responde por danos ao DNA ao induzir apoptose celular ou parando o crescimento. A perda do p53 permite o acúmulo de células com DNA danificado. ⁽²⁰⁻²²⁾

Sumariamente os eventos envolvidos na complexa cascata do processo de metastatização podem ser divididos em: (1) angiogênese tumoral, (2) desagregação das células tumorais desde o tumor primário, mediado por caderinas e cateninas, (3) invasão e migração através da membrana basal e matriz extracelular em torno do epitélio tumoral, com subsequente invasão da membrana basal do endotélio dos vasos sanguíneos locais; esta é mediada por integrinas e proteases, incluindo as metaloproteinases de matriz e catepsinas, (4) introdução das células tumorais dentro dos vasos sanguíneos, (5) aderência das células tumorais circulantes ao endotélio do leito capilar do órgão alvo; isso ocorre através de interações adesivas entre as células tumorais e o endotélio, envolvendo selectinas, integrinas e membros da superfamília das imunoglobulinas – IgSF, (6) invasão das células tumorais através da camada de células endoteliais e em torno da membrana basal, (7) desenvolvimento de um foco de tumor secundário no órgão alvo. ⁽²³⁻²⁵⁾

2.3. Matriz Extracelular

Durante a suas vidas, as células possuem um propósito comum, o de secretar e remodelar um sistema complexo de proteínas – a matriz extracelular (ME). Tanto como

provendo uma flexível, mas resistente, plataforma para a organização das células em tecidos, a ME exerce um extraordinário controle no comportamento celular. Possui a capacidade de determinar se haverá proliferação ou repouso celular, migração ou permanência estacionária e, desenvolvimento ou apoptose celular. ⁽²⁶⁾

Ha duas formas de ME: a membrana basal e a matriz intersticial. Cada uma delas varia em sua composição e propriedades, dependendo da característica e localização celular ou do tecido em que se encontra ou do estagio de desenvolvimento do organismo. ⁽²⁶⁾

Estão presentes na constituição da ME, diferentes combinações de colágenos, proteoglicanos, ácido hialurônico e várias glicoproteínas, como a fibronectina e a laminina, que preenchem a maioria dos espaços intercelulares. ⁽²⁴⁻²⁶⁾

O processo de adesividade celular possui especial implicação sobre a transdução de sinais e está envolvido na transferência de informações entre as células. A ligação das células à matriz extracelular também sinaliza para dentro do citoplasma e leva a reorientação do citoesqueleto e a mudanças no comportamento celular como, por exemplo, no estímulo à proliferação celular. ⁽²⁷⁾ São definidas quatro principais classes de receptores celulares envolvidos nas interações célula-célula e célula-matriz: caderinas, selectinas, superfamília de receptores de imunoglobulinas e integrinas. ⁽²⁸⁾

Em muitos tumores primários com propriedades invasivas, a adesão intercelular está reduzida, frequentemente em decorrência a uma perda da E-caderina, um mediador direto da adesão célula-célula. A cauda citoplasmática da E-caderina é amarrada, através de [alfa]-catenina e [beta]-catenina, ao citoesqueleto de actina; uma das propriedades da actina é manter a junção celular. A importância da manutenção da adesão intercelular foi demonstrada em um modelo de câncer pancreático de rato, onde a ruptura da expressão da E-caderina levou à invasão por metástases precocemente. ⁽²⁹⁾ Diversos mecanismos podem causar uma perda da E-caderina: mutações, resultantes de uma inativação protéica, em silenciamento gênico por metilação de um promotor, ou por uma regulação contrária ao crescimento, estimuladas pelos receptores do fator de crescimento (por exemplo, receptor do fator de crescimento epidérmico [EGFR], receptor do fator de crescimento fibroblástico [FGFR], receptor do fator de crescimento ligado a insulina I [IGF-I]). ^(29,30) A expressão do gene da E-caderina (CDH1), também é inibida por vários repressores da transcrição. ⁽³⁰⁾ Perdas na funcionalidade da E-caderina são necessárias, embora não suficientes, para a transição epitelial para mesenquimal, um processo através do qual as células epiteliais mudam para um fenótipo de células progenitoras mesenquimais, permitindo o descolamento e reorganização

das células epiteliais durante o desenvolvimento embrionário, bem como a invasão tumoral e metástases. ⁽³¹⁻³⁵⁾

A adesão celular à vizinhança da ME pode determinar o seu formato, manter a função celular adequada e a integridade do tecido. A matriz extracelular também auxilia o ancoramento das células, sinaliza o tráfego celular e dirige a diferenciação celular. O controle do comportamento celular parece se originar em resposta às interações célula-matriz. As proteínas adesivas da matriz não apenas promovem a adesão celular como também estimulam a migração celular. A matriz também pode exercer seu efeito na diferenciação celular agindo como fator indutor, fazendo com que as células capazes respondam à ativação por hormônios ou por outros fatores solúveis, ou mesmo, a própria matriz pode fornecer um sinal indutivo. ⁽³⁶⁾

Os efeitos da ME nas células é principalmente mediado pelas integrinas, que são uma grande família de receptores de superfície celular que ligam e também mediam a adesão aos componentes da ME, organizam o citoesqueleto e ativam caminhos de sinalização intracelulares. Cada integrina consiste de duas sub-unidades transmembrana tipo I: alfa (α) e beta (β). Existem 18 subunidades alfa e 8 beta, associadas em varias combinações, para formarem 24 integrinas, que podem se ligar a distintos, embora parcialmente sobrepostos, subconjuntos de ME. ^(37,38)

Como consequência de todos os processo relativos a carcinogênese, as células que foram submetidas a transformação neoplásica são muito menos dependentes da adesão na matriz extracelular (ME), para sua sobrevivência e proliferação. ⁽³⁷⁾ Mesmo a despeito desta relativa independência de ancoramento celular, as células cancerígenas parecem se beneficiar de sinalizações das integrinas, tanto durante a iniciação quanto a progressão do tumor. ^(39,40)

A matriz extracelular serve como um andaime, onde ao longo do qual as células anexam-se e movimentam-se através de contactos entre receptores da superfície celular, denominados integrinas e, componentes de matriz extracelular, como fibronectina, colágeno e laminina. As integrinas também interagem em um complexo citoplasmático constituído de kinases de aderência focal e kinases da família SRC, para mediar a adesão ao citoesqueleto de actina. Através da guanosina trifosfatase dependente de cálcio (GTPases), os sinais da ME ocasionam modificações individuais no citoesqueleto, formando extensões citoplasmáticas chamado filópodes, que coalescem em grandes estruturas, importantes no movimento migratório. ⁽¹⁴⁾

2.4 Angiogênese

Ao decorrer o complexo sistema de desenvolvimento tumoral, inicialmente quando o diâmetro da neoplasia é inferior a dois milímetros, o sistema nutricional é realizado através da difusão desde os tecidos vizinhos, mas, além dessa dimensão, torna-se essencial o suprimento através de vasos sanguíneos próprios. Este desenvolvimento é denominado angiogênese tumoral. É um processo que funcionalmente relaciona-se com as metástases tumorais, envolvendo eventos fisiopatológicos como: mobilidade celular, proteólise tecidual e proliferação celular. A angiogênese depende de interações moleculares específicas entre as células vasculares e dos componentes da matriz extracelular. ⁽⁴⁰⁾

O estímulo através das citocinas às células endoteliais do vaso, à degradação da lâmina basal pela atividade das proteases de matriz e a migração das células endoteliais para o estroma perivascular, com proliferação e início do broto capilar, são etapas envolvidas na angiogênese. A fonte dos estímulos angiogênicos aponta a direção da migração. O broto vascular expande-se e assume a conformação tubular, com o desenvolvimento de uma nova lamina basal. A proliferação do endotélio permite uma extensão dos túbulos da microvasculatura, que se unem por anastomose e originam uma cadeia circulatória funcional. ⁽⁴¹⁻⁴³⁾

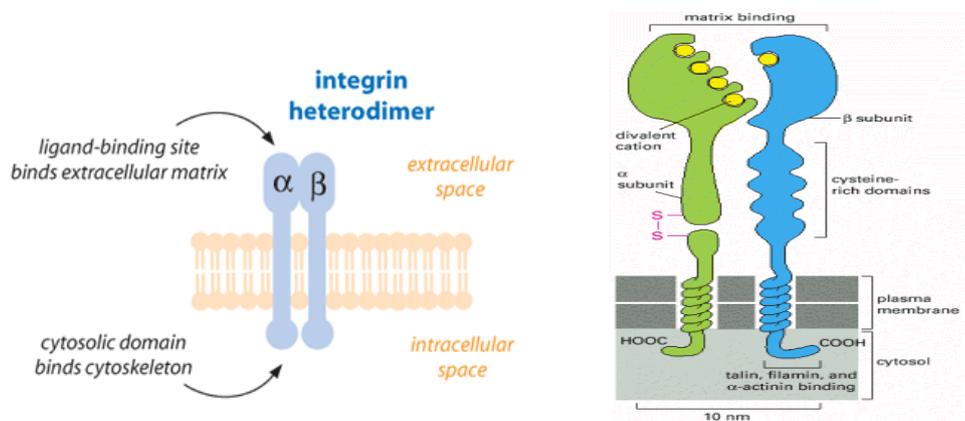
Os eventos adesivos necessários para a angiogênese são rigorosamente regulados e limitam-se as células afetadas. São ativados por períodos de tempo pequenos e após, completamente suprimidos. Quando o endotélio encontra-se sem atividade angiogênica, a integrina alfa v beta 3 ($\alpha_v \beta_3$) praticamente não é detectada, entretanto, na angiogênese induzida por citocinas ou tumores, sua expressão é intensamente estimulada. ⁽⁴⁴⁾

2.5. Integrinas

As integrinas são uma grande família de glicoproteínas que constituem grupos de receptores da superfície celular, os quais possuem duas subunidades, designadas alfa (a maior, com 120-170 kDa) e beta (a menor, com 90-100 kDa), associadas de maneira não covalente. Elas mediam a adesão entre as células e destas com as proteínas da matriz extracelular da membrana basal. As integrinas têm papel importante em diversas etapas celulares - crescimento, desenvolvimento, morfologia e a indução de eventos sinalizadores essenciais para a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular, bem como no desenvolvimento de tumores. Uma característica importante destas moléculas é que elas existem em estados inativos ou ativos, de acordo com o estímulo celular. Uma célula ativada pode transmitir um

sinal a partir de seu citoplasma e, assim, modificar a conformação dos domínios extracelulares das integrinas da membrana celular, aumentando sua afinidade pelos ligantes (sinalização “inside out”). Da mesma forma, a união de uma integrina com seu ligante pode afetar processos intracelulares, incluindo proliferação e apoptose (sinalização “outside in”).^(45,46)

Os domínios da subunidade beta conectam-se a filamentos de actina do citoesqueleto por meio de proteínas intracelulares como talina, vinculina e a-actinina. Nesse processo, regulam a organização do citoesqueleto, ativam cascatas de quinases sinalizadoras e modulam o ciclo celular. Algumas integrinas são expressas constitutivamente, ou seja, são produzidas normalmente pelo organismo em condições fisiológicas. Outras, entretanto, possuem regulação diferenciada e respondem a estados de ativação das células, por exemplo, por citocinas angiogênicas [VEGF (vascular endothelial growth factor), TGFb (tumor growth factor b), bFGF (basic fibroblast growth factor)].⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾ A regulação da atividade "inside out" protege o hospedeiro da adesão patológica mediada pela integrina. Tanto a sinalização "outside in" quanto a "inside out" estão associadas a alterações conformacionais distintas no segmento extracelular das integrinas. Estas mudanças variam com o tipo e natureza do ligante e são moduladas por cátions divalentes.⁽⁴⁸⁾



Figuras 1 e 2: Estrutura básica de uma integrina (Fonte:www. pmsalves.wordpress.com)

Até o momento, foram identificadas 18 subunidades alfa e 8 subunidades beta, que formam ao todo 24 receptores distintos. Os domínios de ligação citoplasmáticos das integrinas incluem proteínas tirosino-quinases (focal adhesion kinase - FAK e Syk) e proteínas do citoesqueleto (talina e paxilina). Os domínios transmembrana e extracelular das integrinas também interagem com outras proteínas de membrana, que podem modular a sinalização celular. A afinidade para o ligante no domínio extracelular é regulada através de

mudanças na conformação das regiões de ligação. O contato entre as subunidades alfa e beta envolve suas metades amino-terminais que, juntas, formam uma "cabeça" globular e, as porções remanescentes, formam duas caudas em formato cilíndrico, que transpassam a membrana plasmática. Ambas subunidades, alfa e beta, apresentam um pequeno domínio transmembrana (20 a 30 resíduos) e uma região intracelular (20 a 50 resíduos).⁽²⁸⁾ Existem duas séries principais de integrinas: aquelas onde a sub unidade A contém uma região extra de ~180 aminoácidos, o domínio alfa-A, e aquelas que não têm. O domínio alfa-A é formado por um conjunto de aminoácidos próximos à função amino-terminal, capaz de se ligar a cátions bivalentes, como Ca^{2+} ou Mg^{2+} , representando o sítio de adesão dependente de íon metálico - MIDAS. A subunidade beta também possui um domínio tipo-A, o domínio beta-A. Para integrinas com dois domínios A, o domínio alfa-A é que participa da ligação com o ligante e pouco se sabe da função do domínio beta-A. Para as integrinas que possuem apenas o domínio beta-A, este é responsável pela ligação com o ligante.⁽⁴⁸⁾

Para a diferenciação e o crescimento, as células necessitam estarem ancoradas a um substrato. Esta ligação estimula e controla a progressão através do ciclo celular. Quando as integrinas não conseguem se ligar a uma matriz, as células evoluem para a apoptose.⁽⁴⁵⁾

Defeitos na interação entre moléculas de adesão possuem papel importante no desenvolvimento do câncer e a presença ou ausência destes, contribui para o desenvolvimento das características das células neoplásicas, que são: crescimento incontrolado, invasividade local e capacidade de metastatização. À medida que o tumor se desenvolve, as propriedades de adesão de suas células modificam-se e elas desligam-se da massa tumoral e adquirem a capacidade de migrar e invadir outros órgãos. Estas características podem surgir quando as células neoplásicas reduzem a produção de proteínas da matriz, como a fibronectina, e tornam-se capazes de descolar-se do tumor. Outras células podem perder as E-caderinas (que estabilizam as ligações moleculares entre células adjacentes) e, desta forma, tornar-se móveis e invasivas. O nível de expressão da integrina $\alpha_v \beta_3$ correlaciona-se com a invasividade dos melanomas e a expressão da integrina $\alpha_2 \beta_1$ aumenta a tendência de metastatização dos rabiomiossarcomas. O tripeptídeo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) bloqueia várias integrinas através da interação com seus ligantes, inibindo o comportamento invasivo de células de melanoma *in vitro* e, reduzindo o número de depósitos metastáticos destas células *in vivo*.^(49,50)

Desta forma, parece que o desenvolvimento de uma célula tumoral e sua disseminação seguem mecanismos semelhantes, havendo perda de adesão por diminuição da função das

caderinas, seguida pela aquisição de receptores que fornecem propriedades invasivas e migratórias para as células, através da ação das integrinas. ⁽⁵⁰⁾

Durante a progressão do crescimento tumoral até metástases, sinais específicos das integrinas permitem as células cancerosas desanexarem-se das células vizinhas, re-orientar a polaridade durante a migração, sobreviver e multiplicarem-se no microambiente. Há crescentes evidências de que determinadas integrinas associam-se a receptores tirosina quinases (RTK) para ativar as vias de sinalização que são necessárias para a invasão tumoral e metástases. O efeito destas integrinas pode ser especialmente importante em células que possuem mutações ou amplificações dos genes que codificam estes RTK. ^(26,51)

E cada vez mais claro que as células neoplásicas realçam a expressão das integrinas em prol da proliferação, sobrevivência e migração, considerando que eles tendem a perder a expressão das integrinas que exercem efeito oposto. Embora a sinalização das integrinas contribui para o crescimento tumoral, alguns estudos sugerem que a desregulação da RTK-Integrina seja crucial a invasão tumoral e metástases. As integrinas exercem um controle específico e rigoroso sobre a ação dos RTKs. ^(26,51)

Um estudo de revisão propôs que mudanças nas integrinas, em conjunto com mutações ativadoras em certos RTKs, como ERB-B2 e Met, ocasionem junções constituídas da sinalização de integrina-RTK, que permitem as células tumorais migrarem e proliferarem independentemente da posição confinada. Também, muitas integrinas estão localizadas em uma posição de superfície da célula e ativam proteases que degradam a matriz, como as metaloproteases de matriz e plasmina. Ambos os tipos de mudanças são provavelmente a chave para a invasão tumoral e metástase. É provável que cada tipo de tumor siga características e mudanças dinâmicas na expressão das integrinas durante a progressão do tumor. Estudos futuros irão desvendar toda a complexidade dessas mudanças, e pode muito bem ficar claro, que algumas mudanças são mais importantes do que outras. Será então necessário para testar a relevância destas mudanças na expressão e sinalização das integrinas em modelos de câncer. Uma validação genética da existência de integrinas pró-neoplásicas deve abrir o caminho ao desenvolvimento de terapia anti-integrina para tratamentos. ⁽²⁶⁾

As integrinas sinalizam uma série de eventos, entretanto, não possuem atividade enzimática intrínseca. A transdução do sinal pela interação do ligante depende, portanto, do recrutamento de moléculas sinalizadoras cruciais, em particular, quinases de proteínas, quinases de lipídeos, GTPases e fosfatos. Vários caminhos sinalizadores ativados por integrinas também são ativados por receptores de fatores de crescimento. ⁽⁵²⁾

2.6. Integrina alfa(v) beta(3) ($\alpha_v\beta_3$)

Entre o grupo das integrinas, um dos membros mais importantes é o receptor alfa(v) beta(3) ($\alpha_v \beta_3$), que parece ser regulado durante o desenvolvimento tumoral. O receptor integrina $\alpha_v \beta_3$ também desempenha papel significativo na angiogênese tumoral, apoptose e no processo de transdução de sinais. Na angiogênese, as células do endotélio aumentam a expressão da integrina $\alpha_v \beta_3$, que nesta atua como um constituinte de superfície que potencializa a invasão e proliferação celular. Estudos recentes mostram que a colagenase MMP-2 liga-se diretamente a integrina $\alpha_v \beta_3$ na superfície das células tumorais invasivas, facilitando a invasão celular.⁽⁵⁰⁾ Antagonistas da integrina $\alpha_v \beta_3$ podem induzir a apoptose de células vasculares, reduzindo o suprimento sanguíneo para tumores sólidos.⁽⁴⁵⁾

A integrina $\alpha_v \beta_3$ possui também a propriedade de fagocitose celular durante a apoptose e pode participar de processos de remodelação óssea. Descrita também como receptor de vitronectina, a integrina $\alpha_v \beta_3$ pode ser encontrada em uma grande parte de células originadas do mesenquima. É importante a propriedade desta integrina pela sua afinidade por proteínas adesivas como vitronectina, fibronectina, fibrinogênio, laminina, colágeno e fator de Von Willebrand, colágeno tipo I e osteopontina.⁽⁵³⁾ As integrinas envolvidas na migração celular são altamente expressadas nas células tumorais, como a integrina $\alpha_v \beta_3$, que é responsável pela ligação das proteínas com a matriz extracelular.^(28,54)

A integrina em questão já teve sua estrutura tridimensional determinada e, embora com mecanismos de ativação propostos ainda controversos, parece haver o envolvimento de duas diferentes conformações: uma em que os domínios citoplasmáticos e trans-membrânico das subunidades alfa e beta estejam alinhados e próximos um ao outro e os segmentos extracelulares dobrados em forma de “V”, semelhante a um joelho entre os módulos (conformação inativa) e outra, com os domínios separadamente alinhados, com os segmentos extracelulares assumindo uma conformação mais vertical (conformação ativa).⁽⁴⁸⁾

O estado de repouso inativo das integrinas, em que apresentam baixa afinidade por ligantes, é ativado de dentro da célula por meio das regiões citoplasmáticas e trans-membrana (sinalização "inside out"). A ativação pode ser induzida pela ligação da talina à região citoplasmática da subunidade beta e resulta em uma certa separação dos domínios citoplasmáticos e levantamento e alinhamento das regiões extracelulares. O movimento das hélices do domínio beta-A leva ao reposicionamento dos íons metálicos, causando aumento de afinidade pelos ligantes extracelulares. Após a interação com ligantes extracelulares, ocorrem

mudanças na mobilidade lateral das integrinas na membrana plasmática, introduzindo agrupamento de integrinas. Estes agrupamentos parecem ser importantes para desencadear a ativação de diferentes cascatas de sinalização citoplasmáticas (sinalização de "outside in").
(48,55)

2.7. Invasão celular tumoral

Para atingir os vasos sanguíneos ou linfáticos, as células tumorais devem penetrar no estroma. Pelo menos três mecanismos podem estar envolvidos na invasão tecidual das células tumorais. Em primeiro lugar, a pressão mecânica produzida pela rápida proliferação neoplásica pode forçar as células ao longo de planos teciduais de menor resistência. Em segundo lugar, o aumento da motilidade celular também pode contribuir para a invasão e, por fim, a secreção pelas células tumorais invasivas de substâncias que degradam a membrana basal, fazem com que ela se torne permeável não apenas a moléculas, mas também às células invasivas. ^(04,12,14,15)

O aumento da motilidade da célula tumoral é precedido pela perda das forças coesivas entre as células, o que, nas células epiteliais, se associa à diminuição da expressão das E-caderinas (glicoproteína de superfície envolvida na coesão homotípica célula-célula dependente de cálcio). As E-caderinas localizam-se no complexo de junção epitelial e são responsáveis pela organização, manutenção e morfogênese dos tecidos epiteliais. ⁽⁵⁶⁾ Níveis reduzidos de E-caderinas associam-se à diminuição da diferenciação celular tecidual e ao aumento do grau em carcinomas. Carcinomas diferenciados expressam níveis mais elevados de RNA mensageiro de E-caderinas do que carcinomas mais indiferenciados. Mutações do gen das E-caderinas e anormalidades da alfa-catenina (uma proteína associada às E-caderinas) associam-se à transição de células de um fenótipo não invasivo a um fenótipo invasivo. Além disso, a transição do DNA que codifica as E-caderinas para o interior de células invasivas inibe sua motilidade ⁽⁵⁷⁾, o que se associa com alterações nos elementos do citoesqueleto e com resposta ao fator de automotilidade das citoquinas ⁽⁵⁸⁾, fator cicatricial (scatter) ⁽⁵⁹⁾, tromboplastina, matriz extracelular e monoquinas derivadas de monócitos. ⁽⁶⁰⁾

Outra característica das células tumorais invasivas é a secreção de enzimas capazes de degradar as membranas basais, as quais servem como barreira entre as células epiteliais e o estroma. Células epiteliais e estromais produzem uma mistura de colágenos, proteoglicanos e outras moléculas que contêm ligantes para receptores de adesão, o que confere

permeabilidade para moléculas, mas não para células. Células de câncer de cólon também secretam componentes da membrana basal, como a laminina.⁽⁶¹⁾ Carcinomas de cólon bem diferenciados produzem grande quantidade de lamininas, enquanto carcinomas menos diferenciados produzem células com membrana basal descontínua, pobre em laminina.⁽⁶²⁾ Uma diminuição do conteúdo de laminina também é demonstrada nas membranas basais de pólipos adenomatosos displásicos, mas a descontinuidade da membrana basal é vista apenas nos carcinomas de cólon.⁽⁶³⁾ Os proteoglicanos, incluindo sulfato de condroitina, sulfato de heparina, hialuronato e heparina são outros constituintes maiores da matriz extracelular, cuja principal função é ser reservatório para fatores de crescimento que podem ser liberados na forma ativa através da degradação da matriz extracelular.⁽⁶⁴⁾

Para invadir a membrana basal, uma célula tumoral deve inicialmente ligar-se aos componentes da matriz extracelular através de uma interação receptor-ligante. Um grupo de tais receptores de superfície são as integrinas, que se ligam especificamente a laminina, ao colágeno ou a fibronectina.^(65,66) Diversas integrinas que se ligam a diferentes componentes da matriz extracelular estão expressas na superfície de células de carcinomas humanos. Progressão tumoral tem sido associada à diminuição gradual da expressão de integrinas, sugerindo que a perda destas, associado à perda de E-caderinas, pode facilitar o descolamento da neoplasia primária.⁽⁶⁷⁾

2.8. Integrinas e câncer

O papel das integrinas na progressão tumoral e na formação de metástases é dicotômico. A expressão diminuída de algumas integrinas associa-se a transformação celular e tumorigênese, como no caso das integrinas alfa(5) beta(1) e alfa(2) beta(1) no carcinoma de cólon e no tecido mamário, respectivamente.^(68,69) Por outro lado, a expressão de algumas integrinas correlaciona-se diretamente com a gênese e a progressão tumoral. A integrina alfa(v) beta(3) está presente no melanoma metastático, mas não em lesões melanocíticas benignas e, esta freqüentemente expressada em osteossarcomas, neuroblastomas, carcinomas de pulmão, mama, próstata e bexiga, glioblastomas e melanomas invasivos.^(70,71) Anticorpos contra a integrina alfa(v) bloqueiam o crescimento de melanomas humanos transplantados em camundongos.⁽⁷²⁾ A expressão de integrina alfa(6) está aumentada no câncer de orofaringe, de bexiga e de pulmão.⁽⁷³⁻⁷⁸⁾

Evidências clínicas e pré-clínicas indicam que as integrinas vasculares podem ser alvos terapêuticos válidos e que a inibição da função da integrina alfa(v) beta(3) suprime eficientemente a angiogênese e inibe a progressão do tumor. ⁽⁷⁹⁾

Estratégias anti-angiogênicas tem apresentado progresso para o tratamento do câncer e prevenção da recidiva e metástases. As integrinas são uma família de moléculas de adesão celular constituída por duas subunidades (alfa e beta) trans-membrana, ligadas não-covalentemente e pesquisas têm demonstrado que a sinalização da integrina desempenha um papel-chave na angiogênese tumoral e nas metástases. A integrina $\alpha_V \beta_3$ é altamente expressa em células endoteliais ativadas e em células tumorais, mas não está presente em células endoteliais que estejam em repouso e na maioria dos sistemas orgânicos normais, o que a torna um alvo adequado para a terapia anti-angiogênica. ⁽⁸⁰⁾

2.9. Integrinas e câncer de colo uterino

Dentre as integrinas estudadas em câncer de colo uterino, temos as seguintes: a(v)b(3), a(IIb)b(3), a(2)b(1), a(3)b(1), a(5)b(1), a(6)b(4), a(10.1.2), a(v), a(2), a(3), a(4), a(5), a(6), b(1) e b(4). A integrina $\alpha_V \beta_3$ é considerada uma das mais importantes moléculas de superfície celular que regulam as propriedades invasivas das células cervicais tumorais devido a sua atividade gelatinase / metaloproteases de matriz. ^(81,82)

As metaloproteases de matriz (MMP) são proteínas de membrana capazes de digerir a matriz extracelular. Estudos sugerem que a MMP-2 liga-se a integrina $\alpha_V \beta_3$ na superfície das células cervicais neoplásicas, facilitando a invasão celular tumoral. ^(82,83)

A integrina beta 3, além de desempenhar um papel importante na angiogênese, também é expressa em vários tipos de câncer de células epiteliais. No estudo que avaliou o valor prognóstico da expressão desta integrina em pacientes com câncer do colo uterino, tanto em carcinomas epidermóides ou adenocarcinomas, em biópsias dos mesmos, com a análise de imuno-histoquímica para integrina beta 3, o impacto da imunorreação na sobrevida foi o objetivo principal, avaliado por análise uni e multivariada e, sua correlação com características clinico-patológicas. A integrina beta3 foi expressa em 61% dos pacientes. As curvas de sobrevida livre de progressão local, sobrevida livre de metástases à distância e sobrevida causa-especificas foram significativamente menores (P-valores de acordo com o teste log-rank: 0,002, 0,04 e 0,01, respectivamente) em pacientes com expressão de integrina beta3. O impacto prognóstico deste parâmetro foi superior à de outros parâmetros

prognósticos conhecidos e permaneceu estatisticamente significativo na análise multivariada. ⁽⁸⁴⁾

Os carcinomas epidermóides de colo uterino são histologicamente compostos de ilhas de células tumorais cercadas por volumes variáveis de estroma tumoral, influenciados pelo TGF-beta(1) local. O TGF-beta(1) é secretado em um complexo inativo com o peptídeo associado à latência (LAP). Tanto o LAP como as proteínas da fibronectina da ME são ligantes importantes para o receptor das integrinas. A integrina alfa v beta 6 é fracamente expressa em epitélio normal, mas em diferentes carcinomas ela geralmente reflete um fenótipo mais agressivo. Na análise da expressão desta integrina por imunohistoquímica, em pacientes com neoplasia de colo uterino com estágio FIGO IA a IIB e, em NIC e metástases linfonodais, o epitélio normal evidenciou fracamente a expressão, mas, nos carcinomas, a forte expressão celular correlacionou-se diretamente com parâmetros clínico-patológicos e com uma pior sobrevida global e sobrevida livre de doença. ⁽⁸⁵⁾

À expressão das integrinas em neoplasias cervicais foram também estudadas através de imunohistoquímica, em exames coletados através de colposcopia, em um estudo prospectivo. Neste, foram empregados anticorpos monoclonais contra integrinas beta 1-4, alfa 1-6 e alfa v. A beta 1, beta 4, alfa 2, alfa 3, alfa 6 e alfa v foram expressas pela camada basal do epitélio escamoso normal cervical e por células displásicas na NIC I e II; em NIC III, estas integrinas foram expressas, tanto no epitélio da ectocérvix quanto restrito à camada basal. Nestes últimos casos, a expressão da integrina foi restrita em um maior grau pelo epitélio escamoso displásico, sendo que os padrões de expressão das integrinas diferem nas células neoplásicas cervicais do que no epitélio cervical normal. ⁽⁸⁶⁾

As integrinas desempenham um papel importante no crescimento celular, desenvolvimento, morfologia, sinalização e também no desenvolvimento tumoral. Entre o grupo de receptores da superfície celular das integrinas, um dos mais importantes membros é o receptor da integrina $\alpha_v \beta_3$. Esta integrina também é conhecida como receptor da vitronectina, que é uma glicoproteína adesiva, conhecida por promover a fixação e a propagação de diferentes tipos de células in vitro. Evidências dizem que a expressão deste receptor é regulada durante o desenvolvimento tumoral e muitos estudos tem sido realizados para determinar o papel da alfa(v) beta(3) em melanomas humanos, sendo que a expressão deste receptor em melanomas metastáticos, sugere um papel para esta integrina na regulação da proliferação tumoral. O receptor da integrina $\alpha_v \beta_3$ também desempenha um papel significativo na angiogênese, apoptose e transdução. Estudos recentes mostram que a MMP-2

colagenase liga-se diretamente a integrina alfa(v) beta(3) na superfície de células tumorais invasivas e facilita a invasão de células tumorais. No estudo da expressão do receptor da integrina alfa(v) beta(3), tanto em tecidos neoplásicos e normais de colo uterino, pois sendo o receptor ligante da interação um fenômeno da superfície celular, a fração da membrana do tecido tumoral foi separada e, a expressão do receptor da integrina alfa(v) beta(3) analisada por ELISA e imunoprecipitação da fração protéica extraída da membrana. Comparativamente, ELISA e imunoprecipitação claramente demonstraram muito maior expressão de integrina $\alpha_v \beta_3$ na fração de membrana em tumores cervicais malignos humanos do que em frações de membrana de tecidos não malignos. ⁽⁵⁰⁾

Ambas as subunidades das integrinas possuem um grande domínio extracelular, um domínio trans-membrana e um curto domínio citoplasmático. As subunidades beta da maior parte das integrinas são marcadamente semelhantes, enquanto que as alfas, demonstram uma considerável seqüência heterogênea. Com este resultado, a subunidade alfa parece conferir à especificidade ligante das varias integrinas. A interação entre uma integrina em particular e seu ligante são fatores chaves associados a transdução intra-celular dos sinais. A porção citoplasmática das integrinas provavelmente apresenta interação a proteínas específicas do citoesqueleto, como a talina e a fibulina, que mediam a transmissão de sinais do exterior ao interior da célula. Outras proteínas, como as fibronectinas, podem ligar-se as integrinas e induzir mudanças celulares, que podem alterar as propriedades adesivas das células; talvez desempenhando um papel na invasão, migração e metastatização das células tumorais. ^(45,46)

Embora exista uma ampla evidencia para sugerir que a adesão celular seja vital ao processo carcinogênico, há pouco conhecimento sobre o papel das integrinas no carcinoma de cervix uterino. Assim, um estudo publicado, com o objetivo de determinar e comparar a expressão da alfa 2, alfa 3, alfa 4 e alfa 5 sub-unidades da integrina beta 1, tanto em tecidos normais e tumores de cervix uterina, em 22 amostras de tecido (04 normais e 18 tumores), através de imunohistoquímica (IH), onde os resultados foram mensurados pela seguinte classificação na observação microscópica em relação à intensidade da coloração da integrina: ausente (0), fraca (1), moderada (2) ou forte (3); a análise estatística empregada foi o teste de Wilcoxon para dados não paramétricos. As laminas foram avaliadas independentemente por microscopia ótica por dois dos autores e as observações diferentes foram resolvidas conjuntamente. Nos resultados, a integrina alfa 2 e alfa 3 coraram mais intensamente no epitélio normal da cervix do que no estroma ($p=0,03$). A alfa 4 e alfa 5 coraram similarmente tanto o estroma e no epitélio normal. A alfa 2 esteve ausente no estroma de todos os

espécimes de tumor, apesar de estar presente nas regiões epiteliais de 14 de 18 tumores. A alfa 3 apresentou uma maior intensidade de coloração no estroma do tumor do que nas regiões do epitélio ($p=0,002$). Tanto a alfa 4 e alfa 5 estavam ausentes nas regiões epiteliais do tumor, mas presentes no estroma. Nas conclusões, tanto a distribuição e a intensidade da expressão da integrina em câncer cervical diferem de sua expressão no colo normal. Em particular, a alfa 4 e alfa 5, estiveram ausentes nas regiões epiteliais dos cânceres cervicais, e a alfa 3 também apresentou expressão reduzida no epitélio maligno. Estas alterações se correlacionam bem com as mudanças esperadas na transformação maligna. Embora sendo um estudo observacional pequeno, foi o primeiro a descrever a distribuição e a intensidade da expressão da integrina em câncer cervical. Nestes resultados preliminares, os tumores apresentaram padrão diferente de expressão de integrina do que a cérvix normal. ⁽⁸⁷⁾

3. HIPÓTESE

A presença da expressão imunohistoquímica de integrina alfa v beta 3 ($\alpha_v \beta_3$) em amostras de carcinoma invasor e lesões intraepiteliais de colo uterino associa-se com o prognóstico das pacientes.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a presença da expressão imunohistoquímica da integrina $\alpha_v \beta_3$ em lesões malignas e pré-malignas de colo uterino.

4.2 Objetivos específicos

Classificar os achados por tipo histológico e estadiamento nos casos de doença maligna e em lesões intraepiteliais.

Associar os resultados com o prognóstico e o desfecho das pacientes.

5. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil. INCA. 2009. 32-33.
2. Jemal A, Siegel R, et al. Cancer Statistics 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249.
3. Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, Thun MJ. Global Cancer Facts & Figures. Atlanta GA: American Cancer Society 2007. 23-24.
4. DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: principles & practice of oncology. 8th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
5. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007;370(9590): 890-907.
6. Pecorelli S, Zigliani L, Odicino F. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *Int J Gynecol Obstet*. 2009;105:107-108.
7. Perez CA, Grigsby PW, Nene SM, Camel HM, Galakatos A, Kao MS, Lockett MA. Effect of tumor size on the prognosis of carcinoma of the uterine cervix treated with irradiation alone. *Cancer* 1992;69(11): 2796-2806.
8. Kristensen GB, Abeler VM, Risberg B, Trop C, Bryne M. Tumor size, depth of invasion, and grading of the invasive tumor front are the main prognostic factors in early squamous cell cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1999;74(2): 245-251.
9. Kodama J, Seki N, Nakamura K, Hongo A, Hiramatsu Y. Prognostic factors in pathologic parametrium-positive patients with stage IB-IIB cervical cancer treated by radical surgery and adjuvant therapy. *Gynecol Oncol* 2007;105(3): 757-761.
10. Barillot I, Horiot JC, Pigneux J, Schraub S, Pourquier H, Daly N, Bolla M, Rozan R. Carcinoma of the intact uterine cervix treated with radiotherapy alone: a French cooperative study: update and multivariate analysis of prognostics factors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;38(5): 969-978.
11. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70
12. Weinberg RA. The biology of cancer. New York: Garland Science, 2007.

13. Ministerio da Saude. Instituto Nacional de Cancer. Falando sobre cancer e seus fatores de risco. Rio de Janeiro, 1996. Disponivel em http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319
14. Chian A, Massague J. Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med* 2008;359(26):2814-2823.
15. Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*. 2006;12(8):895-904.
16. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002;2:563-72.
17. Fidler IJ. Critical determinants of metastasis. *Semin Cancer Biol*. 2002;12(2):89-96.
18. Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* 2008;319:1352-1355.
19. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 2006;444(7119):633-637.
20. Sykes SM, Mellert HS, Holbert MA, Li K, Marmorstein R, Lane WS, McMahon SB. Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell* 2006;24:841-51.
21. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(3)220-228.
22. Attardi LD. The role of p53-mediated apoptosis as a crucial anti-tumor response to genomic instability: lessons from mouse models. *Mutat Res*. 2005;569(1-2):145-157.
23. Brooks SA, Lomax-Browne HJ, Carter TM, Kinch CE, Hall DM. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem*. 2010;112(1):3-25.
24. Price JT, Thompson EW. Mechanisms of tumour invasion and metastasis: emerging targets for therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2002;6(2):217-233.
25. Geiger T, Geiger B. Towards elucidation of functional molecular signatures of the adhesive-migratory phenotype of malignant cells. *Seminars in Cancer Biology* 2010; Article in Press. doi:10.1016/j.semcancer.2010.05.004.

26. Guo W, Giancotti F. Integrin signalling during tumor progression. *Nature* 2004;5:816-826.
27. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the Road taken. *Science* 1995;268:233-239.
28. Haubner R, Fisinger D, Kessler H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the $\alpha v \beta 3$ integrin for a new cancer therapy. *Angew Chem Int Ed Eng* 1997;36:1374-1389.
29. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 1998;392:190-193.
30. Wijnhoven BP, Dinjens WN, Pignatelli M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg.* 2000;87(8):992-1005.
31. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:442-54.
32. Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology.* 2007;39(3):305-318.
33. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000;2:76-83.
34. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004;117:927-39.
35. Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives. *Int J Dev Biol* 2009;53(8-10):1541-1547.
36. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987;238:491-497.
37. Ruoslahti E, Giancotti FG. Integrin signaling. *Science* 1999;285:1028-1032.
38. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 673-687.
39. Bissel MJ, Radisky D. Putting tumors in context. *Nature Rev Cancer* 2001; 1:46-54.
40. Wiseman BS, Werb Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science* 2002; 296:1046-1049.

41. Garmy-Susini B, Varner JA. Roles of integrins in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Lymphat Res Biol*. 2008;6(3-4):155-163.
42. Hall K, Ran S. Regulation of tumor angiogenesis by the local environment. *Front Biosci* 2010;15:195-212.
43. Silva THA, Butera AP, Leal DHS, Alves RJ. Angiogenesis inhibitors antitumor agents: pharmacophore to $\alpha v \beta 3$ antagonists. *Rev Bras Cienc Farm* 2007;43(1):01-17.
44. Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of αv integrins during angiogenesis. *Molecular Medicine* 1998;4: 741-750.
45. Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules--Part 1. *N Engl J Med* 1996;334(23): 1526-1529.
46. Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules--Part II: Blood vessels and blood cells. *N Engl J Med*. 1996;335(1):43-45.
47. Gonzalez AM, Bhattacharya R, deHart GW, Jones JC. Transdominant regulation of integrin function: mechanisms of crosstalk. 2010;22(4):578-583.
48. Xiong JP, Stehle T, Zhang R, Joachmiak A, Frech M, Goodman SL, Arnaout MA. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha v \beta 3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 2002; 296:151-155.
49. Brooks PC. Role of integrins in angiogenesis. *Eur j Cancer* 1996; 32:2423-2429.
50. Chattopadhyay N, Chatterjee A. Studies on the expression of $\alpha v \beta 3$ integrin receptors in non-malignant and malignant human cervical tumor tissues. *J Exp Clin Cancer Res* 2001 20(2): 269-75.
51. Ramsay AG, Marshall JF, Hart IR. Integrin trafficking and its role in cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(3-4):567-578.
52. Ruegg C, Mariotti A. Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:1135-1157.
53. Varner JA, Cheresh DA. Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 1996;6:724-730.
54. Taraboletti G, Margosio B. Antiangiogenic and vascular therapy for cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1(04):378-384.

55. Meyer A, Auernheimer J, Modlinger A, Kessler H. Targeting RGD recognizing integrins: drug development, biomaterial research, tumor imaging and targeting. *Curr Phar Des* 2006;12:2723-2747.
56. Wong AS, Gumbiner BM. Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin. *J Cell Biol* 2003;161(6): 1191-203.
57. Frixen UH, Behrens J, et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991;113(1): 173-185.
58. Levine MD, Liotta LA, Stracke ML. Stimulation and regulation of tumor cell motility in invasion and metastasis. *EXS* 1995;74:157-179.
59. Giordano S, Zhen Z, et al. Transfer of motogenic and invasive response to scatter factor/hepatocyte growth factor by transfection of human MET protooncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(2): 649-653.
60. Jiang WG, Puntis MC, et al. Monocyte-conditioned media possess a novel factor which increases motility of cancer cells. *Int J Cancer* 1993;53(3): 426-431.
61. Forster SJ, Talbot IC, et al. Laminin and fibronectin in rectal adenocarcinoma: relationship to tumour grade, stage and metastasis. *Br J Cancer* 1984;50(1): 51-61.
62. Daneker GW, Mercurio AMJ, et al. Laminin expression in colorectal carcinomas varying in degree of differentiation. *Arch Surg* 1987;122(12): 1470-1474.
63. Remy L, Lissitzky JC, et al. (1992). Laminin expression by two clones isolated from the colon carcinoma cell line LoVo that differ in metastatic potential and basement-membrane organization. *Int J Cancer* 1992;51(2): 204-212.
64. Chakrabarty S, Fan D, et al. Modulation of differentiation and proliferation in human colon carcinoma cells by transforming growth factor beta 1 and beta 2. *Int J Câncer* 1990;46(3): 493-499.
65. Ruoslahti E, Engvall E. Integrins and vascular extracellular matrix assembly." *J Clin Invest* 1997;100(11 Suppl): S53-66.
66. Ruoslahti, E. Integrins. *J Clin Invest* 1991;87(1): 1-5.
67. Pignatelli M, Smith ME, Bodmer WF. Low expression of collagen receptors in moderate and poorly differentiated colorectal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 1990; 61(4): 636-638.

68. Varner JA, Emerson DA, Juliano RL. Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin. *Mol Biol Cell* 1995;6(6): 725-740.
69. Zutter MM, Santoro SA, Staatz WD, Tsung YL. Re-expression of the alpha 2 beta 1 integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(16): 7411-7415.
70. Danen EH, Jansen KF, Van Kraats AA, Cornelissen IM, Ruiter DJ, Van Muijen GN. Alpha v-integrins in human melanoma: gain of alpha v beta 3 and loss of alpha v beta 5 are related to tumor progression in situ but not to metastatic capacity of cell lines in nude mice. *Int J Câncer* 1995; 61(4): 491-496.
71. Albelda SM, Mette SA, Elder DE, Stewart R, Damjanovich L, Herlyn M, Buck CA. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res* 1990;50(20): 6757-6764.
72. Mitjans F, Sander D, et al. An anti-alpha v-integrin antibody that blocks integrin function inhibits the development of a human melanoma in nude mice. *J Cell Sci* 1995;108 (Pt 8): 2825-2838.
73. Garofalo A, Chirivi RG, Foglieni C, Pigott R, Mortarini R, et al. Involvement of the very late antigen 4 integrin on melanoma in interleukin 1-augmented experimental metastases. *Cancer Res* 1995;55(2): 414-419.
74. Mariani Costantini R, Falcioni R, Battista P, Zupi G, Kennel SJ, Colasante A, Ventura I, Curio CG, Sacchi A. Integrin (alpha 6/beta 4) expression in human lung cancer as monitored by specific monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1990;50(18): 6107-6112.
75. Gaetano C, Melchiori A, Albini A, Benelli R, Falcioni R, Modesti A, Modica A, Scarpa S, Sacchi A. Retinoic acid negatively regulates beta 4 integrin expression and suppresses the malignant phenotype in a Lewis lung carcinoma cell line. *Clin Exp Metastasis* 1994;12(1): 63-72.
76. Liebert M, Wedemeyer G, Stein JA, Washington RW Jr, Van Waes C, Carey TE, Grossman HB. The monoclonal antibody BQ16 identifies the alpha 6 beta 4 integrin on bladder cancer. *Hybridoma* 1993;12(1): 67-80.
77. Van Waes C, Carey TE. Overexpression of the A9 antigen/alpha 6 beta 4 integrin in head and neck cancer. *Otolaryngol Clin North Am* 1992;5(5): 1117-1139.

78. Van Waes C, Kozarsky KF, Warren AB, Kidd L, Paugh D, Liebert M, Carey TE. The A9 antigen associated with aggressive human squamous carcinoma is structurally and functionally similar to the newly defined integrin alpha 6 beta 4. *Cancer Res* 1991;51(9): 2395-2402.
79. Alghisi GC, Rüegg C. Vascular integrins in tumor angiogenesis: mediators and therapeutic targets. *Endothelial Cell R* 2006;13:113-135.
80. Cai W, Chen X. Anti-angiogenic cancer therapy based on integrin alphavbeta3 antagonism. *Anticancer Agents Med Chem* 2006;6(5):407-428.
81. Chatterjee N, Chatterjee A. Role of alphavbeta3 integrin receptor in the invasive potential of human cervical cancer (SiHa) cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2001;20(3): 211-221.
82. Mitra A, Chakrabarti J, Chattopadhyay N, Chatterjee A. Membrane-associated MMP-2 in human cervical cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2003;22(2): 93-100.
83. Chattopadhyay N, Mitra A, Frei E, Chatterjee A. Human cervical tumor cell (SiHa) surface alphavbeta3 integrin receptor has associated matrix metalloproteinase (MMP-2) activity. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2001;127(11):653-658.
84. Gruber G, Hess J, Stiefel C, Aebersold DM, Zimmer Y, Greiner RH, Studer U, Altermatt HJ, Hlushchuk R, Djonov V. Correlation between the tumoral expression of beta3-integrin and outcome in cervical cancer patients who had undergone radiotherapy. *Br J Cancer*. 2005;92(1):41-46.
85. Hazelbag S, Kenter GG, Gorter A, Dreef EJ, Koopman LA, Violette SM, Weinreb PH, Fleuren GJ. Overexpression of the alpha v beta 6 integrin in cervical squamous cell carcinoma is a prognostic factor for decreased survival. *J Pathol*. 2007;212(3):316-324.
86. Hughes DE, Rebello G, al-Nafussi A. Integrin expression in squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol*. 1994;173(2):97-104.
87. Valea FA, Haskill S, Moore DH, Fowler WC Jr. Immunohistochemical analysis of alpha 1-integrins in cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;173(3 Pt 1):808-813.

6. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

* Abstract enviado ao XXVIII Internacional Congress of the International Academy of Pathology.

Integrin alpha(v) beta(3) expression in premalignant and malignant lesions of the uterine cervix.

Integrin alpha(v) beta(3) expression in premalignant and malignant lesions of the uterine cervix.

Lieverson Augusto Guerra¹, Daniela Dornelles Rosa^{1,2}, Daniela Augustin Silveira³, Maria Isabel Albano Edelweiss^{1,4}

¹ Postgraduation Program in Medicine: Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

² Research Unit, Hospital Femina, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, Brazil.

³ Department of Pathology, Hospital São Vicente de Paulo and University of Passo Fundo, Passo Fundo, Brazil.

⁴ Department of Pathology, Hospital de Clinicas of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

Correspondence

Lieverson Augusto Guerra, MD

R. Marcelino Ramos 83/803, ZIP Code 99010-160.

Passo Fundo, RS, Brazil.

Phone number 55 54 30457007

e-mail: lieverson@hotmail.com

ABSTRACT

Cervix cancer has a high prevalence in Brazil, representing 10% of all malignant diseases in women. For the year of 2010 there is an estimative of 18,430 new cases of cervix cancer in Brazil. A high rate of women with locally advanced disease will recur after primary treatment with chemoradiation, and there are only few therapeutic options available for the recurrent setting. Therefore, there is a need to study new therapeutic targets as well as new prognostic factors for cervix cancer. Preclinical studies showed that the expression of several integrins are associated with neoplastic cellular invasion, angiogenesis and carcinogenesis.

OBJECTIVES: To evaluate the expression of alpha(v) beta(3) integrin in premalignant and malignant lesions of the uterine cervix and to associate its expression with the outcome of patients with cervix cancer. **METHODS:** A retrospective cohort study was performed in the Pathology Unit of Hospital Sao Vicente and in the Pathology Institute of Passo Fundo, Southern Brazil. Archives of patients with premalignant or malignant lesions of the cervix diagnosed from 2001 to 2008 were reviewed and their paraffin-embedded blocks were selected. Immunohistochemistry (IHC) was performed with the specific alpha(v) beta(3) ($\alpha_v\beta_3$) mouse monoclonal antibody BV3 (Abcam, Inc. Cambridge, MA) with a dilution of 1:400. Two gynecologic pathologists independently analyzed the results. **RESULTS:** It was possible to obtain clinical and pathological data from 146 patients. The interobserver kappa concordance for the IHC results was 0.808 ($p < 0,05$). The $\alpha_v\beta_3$ integrin was expressed in only 22 cases (15,06%). From these positive cases, 45,5% had the diagnosis of premalignant lesion and 54,5% of cervix cancer. There were no differences in disease-free survival for patients with cervix cancer with $\alpha_v\beta_3$ expression compared to those without expression. **CONCLUSIONS:** There was no association of $\alpha_v\beta_3$ integrin expression with the outcome of patients with cervix cancer.

KEY-WORDS: Integrins, alpha(v)beta(3), cervix cancer, immunohistology, $\alpha_v\beta_3$ integrin.

INTRODUCTION

Cervix cancer has a high prevalence in Brazil, representing 10% of all malignant diseases in women. For the year of 2010 there is an estimative of 18,430 new cases of cervix cancer in the country.¹

Within the complex cascade of events involved in the process of invasion and migration through the basement membrane and extracellular matrix (ECM) surrounding the tumor epithelium, with subsequent invasion of the basement membrane of the endothelium of blood vessels sites are the integrins and proteases, including matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsins.²⁻⁴ The effects of ECM cells is mainly mediated by integrins, which are a large family of cell surface receptors that bind and also mediate adherence to components of ECM, organize the cytoskeleton and activate intracellular signaling pathways. Each integrin consists of two transmembrane subunits type I alpha (α) and beta (β). There are 18 alpha and 8 beta subunits, associated in various combinations to form 24 integrins that can bind to distinct but partially overlapping, subsets of ECM.^{5,6}

Among the group of integrins, one of the most important members is the receptor alpha(v) beta(3) ($\alpha_v\beta_3$ or vitronectin receptor), which appears to be regulated during tumor development. This receptor also plays significant role in tumor angiogenesis, apoptosis and the process of signal transduction.⁷ Antagonists of integrin alpha(v) beta(3) ($\alpha_v\beta_3$) can induce apoptosis of vascular cells, reducing the blood supply to solid tumors.⁸

Although there is ample evidence to suggest that cell adhesion is vital to the carcinogenic process, little is known about role of $\alpha_v\beta_3$ integrins in malignant and premalignant lesions of uterine cervix. We designed a cohort study to evaluate the role of expression of integrin $\alpha_v\beta_3$ in samples of malignant and premalignant lesion of cervix uterine.

MATERIAL AND METHODS

A retrospective cohort study was performed in the Pathology Unit of Hospital Sao Vicente and in the Pathology Institute of Passo Fundo, Southern Brazil. Archives of patients with premalignant or malignant lesions of the cervix diagnosed from 2001 to 2008 were reviewed and their paraffin-embedded blocks were selected. The immunohistochemistry (IHC) technique consisted of dewaxing sections (3 mm thick) of paraffin-embedded biopsy material in xylene (three changes), followed by rehydration in ethanol. The sections were then

rinsed twice in Tris-buffered saline (TBS: 50mM Tris/HCl (pH 7.4) containing 100mM sodium chloride). Endogenous peroxidase activity was suppressed by treatment with 0.3% hydrogen peroxide in TBS for 10min. Sections were then treated in a microwave oven (180W) for 15min and treated with 1% BSA(Bovine serum albumin in TBS) for 10min to block unspecific binding. They were then incubated with the first antibody: mouse monoclonal $\alpha_v\beta_3$ (BV3, Abcam, Inc. Cambridge, MA) in a dilution of 1:400. Subsequently, the sections were exposed to an affinity-purified biotinylated second antibody (anti-mouse EO 433; Dako, Glostrup, Denmark) diluted 1:200 in TBS for 45min at room temperature, washed three times in TBS and then treated with the avidin–biotin–peroxidase complex (LSAB, Dako) for a similar period at the same temperature. The reaction product was revealed with diaminobenzidine tetrahydrochloride (Kit DAB, Dako). As positive controls we used blocks of malignant melanoma, strongly positive for the antibody (figure 1). Negative controls were slides with no $\alpha_v\beta_3$ antibody. All slides were independently evaluated under light microscope by two pathologists. The results were categorized as positive or negative for integrin $\alpha_v\beta_3$ (Figure 2 shows examples of positive cases). Differences were solved by consensus.

Tumour staging was ascertained by clinical examination under anaesthesia, by chest X-radiography and by computer tomography (CT) of the pelvis. Statistical analysis performed using SPSS software (*Statistical Package for Social Sciences*) version 16.0. Descriptive analysis were made using frequency tables and charts for qualitative variables and measures such as average, minimum, maximum, median and standard deviation (SD) for quantitative variables. The relationship between the expression of integrins and clinical and pathological findings was performed using the *Student t test* for independent samples (continuous variables) and the *Fisher Exact Test* (categorical variables).

This study was approved by the Medical Ethics Committee of the Hospital Sao Vicente de Paulo and Research Ethics Committee of University of Passo Fundo, with registration 167/2009, CAAE n 0111.0.398.000-09. This research followed the resolution 196-96, the National Health Council, which regulates research involving human subjects in Brazil.

RESULTS

We selected 150 samples from a total of 150 patients diagnosed from November 2001 to November 2008. A representative section of each block was examined under optical

microscopy with a hematoxylin and eosin stain (HE), to confirm the diagnosis. Four cases were excluded due to absence of tumor (two cases) and massive necrosis (two cases). A total of 146 cases were selected for analysis. The mean age of patients at diagnosis was 42,7 years (18-88). Most patients were Caucasian (140 patients; 95.9%). There were seventeen disease-related deaths (11.6%) and two deaths not related to the disease (1.4%). Until January 2009, 127 patients were alive and without evidence of disease (87%). The Kappa coefficient value was 0.808, showing substantial agreement between the two pathologists.

The distribution of patients according to diagnosis and stage is showed in table 1. The expression of integrin $\alpha_v\beta_3$ by IHC is showed in table 2. There was expression in only 22 cases (15%). There was no statistically significant association between stage of malignancy and $\alpha_v\beta_3$ expression ($p = 0.585$).

From the positive cases, 54.5% were invasive cancers. There were no differences in the expression of $\alpha_v\beta_3$ integrin in premalignant and malignant lesions ($p = 0.979$) (table 3).

There were 19 deaths, 17 of them related to the disease and two from other causes. The expression of integrin $\alpha_v\beta_3$ was positive in only 1 case of disease-related death. The median survival for patients who expressed $\alpha_v\beta_3$ integrin was 25.7 months and for those that did not express $\alpha_v\beta_3$ integrin it was 32.5 months ($p=0.94$).

DISCUSSION

We have found no association between $\alpha_v\beta_3$ integrin expression and stage of cervical lesions or prognosis of patients with invasive cervical cancer.

The integrin $\alpha_v\beta_3$ has been implicated in the pathophysiology of several malignant tumours.⁹⁻¹¹ Different from our results, Chattopadhyay et al found that the $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor was highly expressed on the membrane fraction of malignant human cervical tumor tissues and comparatively low in the membrane fraction of nonmalignant cervical tumor tissues.⁷ Accordingly, tumor progression of human melanoma from low to high metastatic phenotype was accompanied by an increase in the expression of the $\alpha_v\beta_3$ receptor¹² and that melanoma tumorigenicity depended on the expression of alpha v integrins and availability of vitronectin in situ.¹⁰ The same results were found for beta 3-integrins which expression was associated with an impaired outcome, irrespective of the level of immunoreactivity, in patients with advanced stages of cervical cancer.¹¹

The integrin family of cell surface receptors, proteases like collagenases, are among the important molecules in determining the malignant and invasive properties of tumor cells. A study with two human cervical tumor cell lines (SiHa and HeLa), showed that SiHa cells have a much higher invasive property than HeLa cells, and this experimental findings indicate that the $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor holds one of the key positions in determining the invasive property of cervical cancer cell, by modulating other important regulatory molecules.¹³ Still in preclinical context, other evidence strongly indicate that the integrin $\alpha_v\beta_3$ may regulate matrix degradation and thereby modulate directed motility of human cervical cancer cells.¹⁴

We have some hypothesis to justify our negative findings. First, we analyzed paraffin-embedded blocks that were submitted to different tissue fixation and processing protocols along the years. It is well known that fixation changes the chemical properties of tissue constituents and alters three-dimensional protein conformation by cross-linking, with a great impact on affinity and selectivity of antibodies.¹⁵ Second, we analyzed a small number of cases in each stage of invasive cervical cancer. Therefore, we suggest that the best way to analyze immunoreactivity for $\alpha_v\beta_3$ integrin in cervix cancer is to perform it prospectively.

Integrin positivity was related to both local and distant failure in patients with cervix cancer treated with radiotherapy and might be more an indicator for a bad prognosis in general than a predictor for radiation response.¹¹ In our study from 146 cases 34 were treated with radiotherapy and only 3 of them had expression of $\alpha_v\beta_3$ integrin. Therefore, it was difficult to make any conclusions regarding the impact of $\alpha_v\beta_3$ integrin expression in the response to radiation therapy.

CONCLUSIONS

There was no association between the expression of $\alpha_v\beta_3$ integrin in patients with invasive cervical disease and in patients with intraepithelial cervical disease. Future prospective studies with a higher number of patients may change these findings.

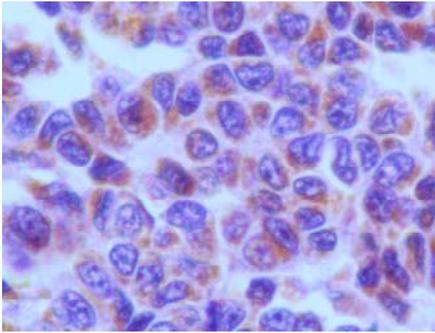


Figure 1. Malignant melanoma positive for the $\alpha_v\beta_3$ integrin antibody (1:400 dilution)

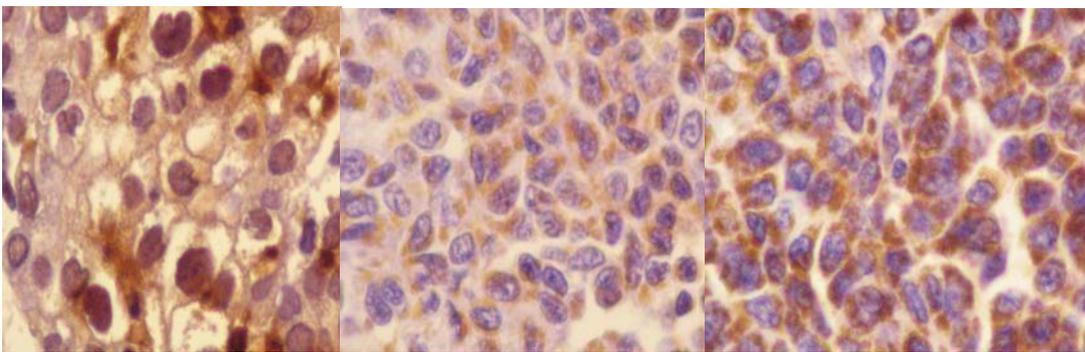


Figure 2 - Positive immunohistochemistry for $\alpha_v\beta_3$ in samples of invasive cervical cancer (1:400 dilution).

Table 1 – Distribution of patients according to diagnosis and stage of cervical neoplasia.

Stage	n	%
Cervical cancer stage IA	14	9,6
Cervical cancer stage IB	7	4,8
Cervical cancer stage IIA	6	4,1
Cervical cancer stage IIB	15	10,3
Cervical cancer stage IIIA	7	4,8
Cervical cancer stage IIIB	18	12,3
Cervical cancer stage IVA	12	8,2
Cervical cancer stage IVB	1	0,7
<i>In situ</i> cervical carcinoma	13	8,9
Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) I	14	9,6
CIN II	4	2,7
CIN III	35	24,0
Total	146	100,0

Table 2 – $\alpha_v\beta_3$ immunohistochemistry results according to diagnosis and stage of disease.

Staging	IHC $\alpha_v\beta_3$		Total
	Positive	Negative	
CIN I	2	12	14
CIN II	1	3	4
CIN III	5	30	35
In situ	2	11	13
IA	5	9	14
IB	2	5	7
IIA	1	5	6
IIB	1	14	15
IIIA	1	6	7
IIIB	1	17	18
IVA	1	11	12
IVB	-	1	1
Total	22 (15,1%)	124 (84,9%)	146 (100%)

* values are presented as n (%).

* $p = 0.585$ (Fisher's exact test).

Table 3 - Integrin $\alpha_v\beta_3$ expression in premalignant and malignant cervical disease.

Lesions	$\alpha_v\beta_3$ IHC		Total
	Positive	Negative	
Malignant	12 (15%)	68 (85%)	80 (100%)
Premalignant	10 (15%)	56 (85%)	66 (100%)
Total	22	124	146

$p = 0,979$ (Chi-Square)

REFERENCES

1. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil. INCA. 2009. 32-33.
2. Brooks SA, Lomax-Browne HJ, Carter TM, Kinch CE, Hall DM. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem.* 2010;112(1):3-25.
3. Price JT, Thompson EW. Mechanisms of tumour invasion and metastasis: emerging targets for therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2002;6(2):217-233.
4. Geiger T, Geiger B. Towards elucidation of functional molecular signatures of the adhesive-migratory phenotype of malignant cells. *Seminars in Cancer Biology* 2010; Article in Press. doi:10.1016/j.semcancer.2010.05.004.
5. Ruoslahti E, Giancotti FG. Integrin signaling. *Science* 1999;285:1028-1032.
6. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 673-687.
7. Chattopadhyay N, Chatterjee A. Studies on the expression of alpha(v)beta3 integrin receptors in non-malignant and malignant human cervical tumor tissues. *J Exp Clin Cancer Res.* 2001;20(2): 269-75
8. Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules--Part 1. *N Engl J Med* 1996;334(23):1526-1529.
9. Vonlaufen A, Wiedle G, Borisch B, Birrer S, Luder P, Imhof BA. Integrin alpha(v) beta(3) expression in colon carcinoma correlates with survival. *Mod Pathol* 2001;14:1126-1132.
10. Sanders LC, Felding-Habermann B, Mueller BM, Cheresch DA. Role of alpha V integrins and vitronectin in human melanoma cell growth. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1992;57:233-40.
11. Gruber G, Hess J, Stiefel C, Aebersold DM, Zimmer Y, Greiner RH, Studer U, Altermatt HJ, Hlushchuk R, Djonov V. Correlation between the tumoral expression of beta3-integrin and outcome in cervical cancer patients who had undergone radiotherapy. *Br J Cancer.* 2005;92(1):41-46.
12. Lafranie RM, Podor TJ, Buchanan MR, Orr FW. Upregulated biosynthesis and expression of endothelial cell vitronectin receptor enhances cancer cell adhesion. *Cancer Res.* 1992;52:2202-2208.

13. Chatterjee N, Chatterjee A. Role of alphavbeta3 integrin receptor in the invasive potential of human cervical cancer (SiHa) cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2001;20(3): 211-221.
14. Chattopadhyay N, Mitra A, Frei E, Chatterjee A. Human cervical tumor cell (SiHa) surface alphavbeta3 integrin receptor has associated matrix metalloproteinase (MMP-2) activity. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2001;127(11):653-658.
15. Fritschy JM. is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. *European Journal of Neuroscience.* 2008;28:2365-2370.

7. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O carcinoma do colo uterino e as lesões pré-invasivas, são temas presentes no cotidiano da prática ginecológica, da oncologia clínica e da patologia. Apesar da elevada incidência e prevalência destas entidades, é nítida a percepção de pequenos progressos científicos na busca de novas opções. As mudanças na prática clínica desta patologia são infrequentes. Comparativamente a outras neoplasias, o investimento mundial na busca de novas opções de tratamento, marcadores de resposta e alvos terapêuticos, são marcadamente inferiores.

Esse estudo retrospectivo procurou contribuir com uma opção de marcador de prognóstico e observou que não houve diferença significativa entre os casos de doença maligna ou pré-invasiva do colo uterino e no desfecho das pacientes. Entretanto, os achados do presente estudo reforçam a necessidade de estudos futuros prospectivos, com maior número de pacientes e avaliando com maior detalhamento, os diferentes tratamentos a que as pacientes foram submetidas.

8. ANEXOS

8.1. Classificação TNM e Estadiamento FIGO do Carcinoma de Cérvix Uterino

Tumor Primário (T)

Categoria Estádio

TNM	FIGO	DEFINIÇÃO
TX	(--)	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	(--)	Sem evidencia de tumor primário
Tis	*	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	I	Carcinoma cervical confinado ao útero (extensão para o corpo deve ser desconsiderada)
T1a**	IA	Carcinoma invasor diagnosticado apenas por microscopia. Invasão do estromal com profundidade máxima de 5 mm (medida a partir da base do epitélio) e propagação horizontal de 7 mm ou menos. O envolvimento de espaços vasculares, venosos ou linfáticos, não afeta a classificação.
T1a1	IA1	Invasão de estroma com 3 mm ou menos e propagação horizontal de 7 mm ou menos
T1a2	IA2	Invasão de estromal com mais de 3 mm mas menos de 5 mm e propagação horizontal de 7 mm ou menos
T1b	IB	Lesão clinicamente visível confinada ao colo do útero ou lesão microscópica maior que T1a/IA2
T1b1	IB1	Lesão clinicamente visível com 4 cm ou menos na sua maior dimensão
T1b2	IB2	Lesão clinicamente visível com mais de 4 cm na sua maior dimensão
T2	II	Carcinoma cervical invade além do útero, mas não chega na parede pélvica nem no terço inferior da vagina
T2a	IIA	Tumor não invade paramétrios
T2a1	IIA1	Lesão clinicamente visível com 4 cm ou menos na sua maior dimensão
T2a2	IIA2	Lesão clinicamente visível com mais de 4 cm na sua maior dimensão
T2b	IIB	Tumor invade paramétrios
T3	III	Tumor estende-se a parede pélvica e ou envolve o terço inferior da vagina e ou causa hidronefrose ou rim não funcionante
T3a	IIIA	Tumor envolve o terço inferior da vagina, sem extensão a parede pélvica
T3b	IIIB	Tumor estende-se a parede pélvica e ou causa hidronefrose ou rim não-funcionante
T4	IVA	Tumor invade a mucosa da bexiga ou do reto e ou estende-se além da pelve verdadeira (edema bolhoso não é o suficiente para classificar um tumor como T4)
M1	IVB	Metástases distantes

* FIGO não inclui mais Estagio 0 (Tis)

** Todas as lesões macroscopicamente visíveis - mesmo com invasão superficial - são T1b/IB.

Fonte: AJCC - Cancer Staging Manual, Seventh Edition, 2010:395-402.

8.2. Técnica de imunohistoquímica

O Anticorpo Primário Mouse monoclonal [BV3] to Integrin alpha V beta 3, 50µg, foi adquirido através de importação e, recebido em condições ótimas de transporte, com embalagem preservada e congelados com cubos de dióxido de carbono (gelo-seco), na temperatura de - 78,5° C. Neste, foi realizado diluições com a finalidade de obter-se alíquotas

de menor concentração e preservação de material congelado para posterior uso ou repetição de testes na eventual necessidade.

Em espécimes de melanoma, houve a realização de testes em diluições de 1:10, 1:50, 1:100 e 1:400. As amostras consideradas positivas nas diluições foram definidas como sendo o controle, semelhantemente ao empregado em outros estudos.

Nos blocos selecionados ao estudo, foi empregada a seguinte metodologia:

Primeiro Dia:

- * corte dos blocos de parafina selecionados e colocados em lâminas “Immunoslides®”, com superfície adesiva característica própria da lâmina;

- * as lâminas permanecem na estufa a 60° C por período de uma noite (12 horas), com intuito de melhor aderência dos cortes e início do processo de desparafinação.

Segundo Dia:

- * desparafinação dos cortes com xilol (Alpha Quimica®) por 20 minutos;

- * hidratação da seção de tecido com 05 mudanças de 03 minutos cada com álcool absoluto;

- * lavagem das lâminas com água destilada;

- * tampão PBS por 05 minutos;

- * panela de pressão: tampão de citrato de sódio fervendo, onde as lâminas são colocadas; fervidas a 100° C por 02 minutos. Após, a panela é retirada do fogo e permanece fechada por mais 01 minuto. Depois, a panela é aberta e resfria por mais 02 minutos;

- * 05 minutos em tampão PBS;

- * realiza-se bloqueio com água oxigenada em 03 trocas de 10 minutos cada;

- * lavagem em água destilada;

- * 05 minutos em tampão PBS;

- * as lâminas são secas cuidadosamente ao redor do tecido;

- * passagem de marcador com finalidade de que o anticorpo não se espalhe;

- * anticorpo primário - Integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ - adicionado em quantidade suficiente para cobertura sobre a amostra de tecido;

* as laminae são incubadas 24 horas, com o anticorpo primário, em câmara escura e úmida;

Terceiro Dia:

- * laminae são retiradas da câmara escura;
- * 05 minutos em tampão PBS;
- * remoção do excesso de tampão;
- * aplicação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako®) por 30 minutos;
- * 05 minutos em tampão PBS;
- * remoção do excesso de tampão;
- * aplicação para revelação, com diaminobenzidina tetraidroclorido (Kit DAB, Dako®) por 20 minutos;
- * lavagem com água destilada;
- * coloração com Hematoxilina de Harris® por 01 minuto;
- * lavagem por 05 minutos em água corrente;
- * desidratar com álcool graduado, xilol.

Tampão PBS:

Tampão PBS (Laborclin®), pó, pH 7,2 - 0,1 ml , diluído em 1.000 ml de água destilada.

Tampão Citrato de Sódio:

Diluição de 2,94 g de citrato de sódio($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em 1.000 ml de água destilada, com 0,5 ml de ácido clorídrico 32% (HCl), com pH de 6.0.

8.3. Ficha de coleta de dados

Numero

Prontuário HSVP

1. Nome _____ 2. Idade

2. Endereço R. _____ N. _____ B. _____
Telefone: _____ Cidade: PF

3. Numero AP - 4. Data diagnóstico ..

4. Diagnostico: Epidermóide Adenocarcinoma

5. Estadiamento NIC I NIC II NIC III
 Ca In situ I II III IV
 A B

6. Grau: 0 I II III IV

7. Tipo de Tratamento:

- o
- Biópsia
- Cone
- Cirurgia Histerectomia / +- LNectomia
- Radioterapia

7. Resultado IH Integrina 1:400: Negativo Positivo Duvidoso

8. Sobrevida:

- Livre de doença
- Óbito relacionado Data Óbito: ..
- Óbito não relacionado Data Óbito: ..
- Evidencia de doença / diagnóstico clinico ou firmado
- Outra _____
- Excluir caso

7. Observações: _____

8.4. Considerações éticas

Este projeto, foi aprovado pela Comissão de Ética Medica (CEM) do Hospital São Vicente de Paulo da Universidade de Passo Fundo e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade de Passo Fundo, com registro 167/2009, CAAE n 0111.0.398.000-09.