

TERESA MARIA REBELO FERREIRA

**ANÁLISE MOLECULAR E CELULAR DA
EXPRESSÃO DA MASPINA EM LESÕES PRÉ-
NEOPLÁSICAS DO COLO UTERINO**

Orientadores:

Prof. Doutor Fernando Mota e Prof. Doutor Carlos Faro

Universidade de Coimbra

**Coimbra
2009**

TERESA MARIA REBELO FERREIRA

**ANÁLISE MOLECULAR E CELULAR DA
EXPRESSÃO DA MASPINA EM LESÕES PRÉ-
NEOPLÁSICAS DO COLO UTERINO**

Tese de Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Doutor Mestre em Ginecologia Oncológica do Curso de Mestrado de Ginecologia Oncológica conferida pela Universidade de Coimbra.

Orientador: Prof. Doutor Fernando Mota
Co-Orientador: Prof. Doutor Carlos Faro



**Universidade de Coimbra
Faculdade de Medicina**

2009

Agradecimentos

A todas as pessoas cujo contributo directo e indirecto foi determinante para a execução deste trabalho, o meu muito obrigado.

Um agradecimento muito especial e muito sentido aos meus orientadores, Professor Doutor Carlos Faro e Professor Doutor Fernando Mota, pela orientação, disponibilidade, pelo incentivo, saber e pragmatismo imprimidos no decorrer da execução da Tese de Mestrado.

À Dra. Teresa Simões da Silva, Assistente de Anatomia Patológica do Serviço de Anatomia Patológica dos HUC, um sentido agradecimento pela dedicação e entusiasmo transmitidos e que se revelaram um motor importante no desenrolar do trabalho, sem o qual não seria possível prosseguir e ultrapassar os momentos de maiores dificuldades.

Agradeço igualmente ao Mário Rui Silva, técnico do Serviço de Anatomia Patológica, pela colaboração e disponibilidade oferecidos na execução deste trabalho.

À Dra. Maria José Simões e Dra. Conceição Egas, do Biocant, pela colaboração e transmissão de conhecimentos relacionados com os estudos moleculares e sem os quais não seria possível o enriquecimento da Tese de Mestrado.

Este projecto foi concretizado no Serviço de Ginecologia e nos laboratórios do Serviço de Anatomia Patológica dos Hospitais da Universidade de Coimbra e nos laboratórios do Biocant em Cantanhede. A dissertação resultou de um projecto de investigação financiado pelo CIMAGO (Centro de Investigação em Meio Ambiente Genética e Oncologia).

Abstract

Maspin is a serine protease inhibitor with tumor suppression activity *in vitro* and *in vivo*. It has been reported that maspin is expressed in normal human mammary epithelial cells but is downregulated during cancer progression and that p53 could induce maspin expression by transcriptional activation. Experimental evidence consistently showed that maspin suppresses tumor growth, invasion and metastasis, induces tumor redifferentiation, and enhances tumor cell sensitivity to apoptosis. Maspin protein isolated from biological sources is a monomer, which is present as a secreted, a cytoplasmic, a nuclear, as well as a cell surface-associated protein. Nuclear maspin is associated with better prognosis of some cancers. It is further noted that extracellular maspin is sufficient to block tumor induced extracellular matrix degradation, tumor cell motility and invasion, whereas intracellular maspin is responsible for the increased cellular sensitivity to apoptosis. Despite these developments, the mechanistic studies of maspin have proven challenging primarily due to the lack of a prototype molecular model.

The dissection and mapping of cervical carcinogenesis consequent to HPV-induced molecular alterations have yielded a series of biomarkers that potentially could be used as surrogates for identification of HPV-related disease in epithelial cells. The biomarkers could predict the biological behaviour of disease and the need for clinical intervention or continued surveillance after a preventive or therapeutic measure. Understanding the interdependent roles that host and viral factors play in cervical cancer pathogenesis is important for distinguishing women at highest risk of human papillomavirus persistence and progression to cervical cancer.

The aim of our study was to evaluate maspin expression in LSIL and HSIL and to determine the relationship between the extent of maspin expression and others biomarkers like HPV in cervical intraepithelial lesions.

In total, 33 cases were evaluated, 19 cases of LSIL / CIN I and 14 HSIL. A monoclonal antibody was used on paraffin/embedded tissues and the immunoreactivity was scored semi-quantitatively using a scale of 0 to 3. The identification of HVP genotypes was made by human papillomavirus PCR amplification using a detection kit optimized to amplify several genital HPV genotypes, including HPV high risk, low risk and previously not classified. The results were analyzed by paired sample Student t-test,

nonparametric Chi-Square test, Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis test. In all statistical tests, significance was considered to be achieved when $p < 0,05$.

A diminished level of maspin expression was observed between HSIL vs LSIL. The maspin expression was also diminished in the cervical intraepithelial lesions associated with high risk HPV. All these differences are not statistically significant. However, there appears to be a trend that might achieve statistical significance if larger number cases are examined. The maspin expression was present in the totality of the cervical epithelium but the basal cells are not evolved in half of the cases of high-grade intraepithelial lesions and this was more frequently associated with high risk HPV. When low-grade lesions expresses maspin immunoreactivity in basal layer of the epithelium, light risk HPV are present or HPV genome are not present.

The results suggests that others factors may contribute for these different behaviour of cervical intraepithelial lesions. The genetic susceptibility between patients was investigated by PCR amplification of regulatory and coding areas of maspin gene followed by Sanger sequencing. No significant statistical differences were found in maspin genotyping between healthy control women and those with cervical intraepithelial lesions.

Resumo

A maspina é uma inibidora da *protease* serina com actividade de supressão tumoral *in vitro* e *in vivo*. É expressa nas células epiteliais normais da mama mas está diminuída na progressão tumoral e a p53 induz a expressão da maspina através da activação dos processos da transcrição. Estudos experimentais têm evidenciado, de forma consistente, que a maspina inibe o crescimento, invasão e metastização tumorais, induz a rediferenciação tumoral e aumenta a sensibilidade das células tumorais à apoptose. Esta proteína é um monómero que nos tecidos biológicos se encontra como produto de secreção, surge ao nível do citoplasma, do núcleo ou como uma proteína da superfície celular. A maspina nuclear está associada a melhor prognóstico de alguns cancros. A maspina extracelular é suficiente para bloquear a degradação da matriz extracelular induzida pelos tumores, a motilidade e invasão tumorais. A maspina intracelular é responsável pelo aumento da sensibilidade celular aos fenómenos da apoptose. Apesar dos progressos na investigação, os estudos sobre a maspina constituem, ainda, um desafio porque não existe um modelo protótipo da sua acção molecular.

O estudo da carcinogénese no cancro do colo uterino tem oferecido uma série de biomarcadores com potencialidades para identificar as alterações moleculares induzidas pelo HPV nas células cervicais. Estes biomarcadores podem ter um valor preditivo sobre o comportamento biológico da doença, a necessidade de intervenção clínica ou de vigilância após medidas preventivas ou terapêuticas. A compreensão do papel dos factores relacionados com o hospedeiro e com o HPV na patogénese do cancro do colo do útero, é importante para identificar as mulheres em que é maior o risco de persistência da infecção por HPV ou de progressão para o cancro cervical.

Com este estudo pretende-se avaliar a expressão da maspina nas LSIL e nas HSIL e determinar as relações entre a grandeza da expressão da maspina com outro biomarcador, o HPV, nas lesões intra-epiteliais cervicais.

Foram avaliadas 33 biópsias cervicais 19 com diagnóstico histológico de LSIL / CIN I e 14 com HSIL (CIN II / CIN III). O estudo da expressão da maspina foi realizado a partir do material biológico conservado em blocos de parafina, utilizando um anticorpo monoclonal específico e com avaliação semiquantitativa da imunomarcção numa escala de 0 a 3. A identificação do tipo de HPV foi efectuada através de amplificação génica por PCR e usando um *kit* de detecção optimizado para amplificar vários genótipos do

HPV, incluindo os de alto e baixo risco. A análise estatística incluiu o Student t-test, o Chi-Square test, o Mann-Whitney test e o Kruskal-Wallis test. Consideraram-se diferenças significativas quando $p < 0,05$.

A expressão da mspina foi menor nas HSIL relativamente às lesões intra-epiteliais de baixo grau bem como, nas lesões associadas ao HPV de alto risco comparativamente ao HPV de baixo risco ou com HPV não identificado. As diferenças, embora, não mostrem significância estatística manifestam uma tendência que poderá ser confirmada com um aumento do número de casos estudados. A expressão da mspina ocorreu em todas as camadas do epitélio cervical mas não houve expressão da mspina na camada basal em metade das lesões intra-epiteliais de alto grau e quando as lesões estavam associadas aos tipos de HPV de alto risco. Quando as lesões cervicais de baixo grau expressavam mspina na camada basal do epitélio, apresentavam HPV de baixo risco ou não eram identificados genomas víricos.

Os resultados sugerem que eventuais factores que levem à diminuição dos níveis de mspina, podem contribuir para um risco acrescido de desenvolver lesões de alto grau. Com o objectivo de avaliar se eventuais polimorfismos genéticos podiam justificar alguns dos desvios observados, procedeu-se á amplificação por PCR de zonas reguladoras e codificadoras do gene da mspina seguida de sequenciação do gene pelo método Sanger, na população com lesões cervicais e numa população controlo, saudável. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as duas populações.

Abreviaturas

SCCA1 – Squamous Cell Carcinoma Antigen 1
SCCA2 – Squamous Cell Carcinoma Antigen 2
PAI1 – Plasminogen Activator Inibitor 1
PAI2 – Plasminogen Activator Inibitor 2
RLS – Serpine Reactive Site Loops
MEC – Matriz extracelular
CAF – Contactos de adesão focais
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
Bax – Bcl2-associated X protein
p53 – gene suppressor tumoral
pRb – gene que codifica a proteína do retinoblastoma
PI3K – PhosphoInositide-3-Kinase
ERK1/2 – Extracellular Signal Regulated Kinases 1/2
uPA – urokinase Plaminogen Activator
uPAR – urokinase Plaminogen Activator Receptor
bFGF – basic Fibroblast Growth Factor
VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor
FAK – Focal Adhesion Kinase
EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor
Hif-1 α – Hypoxia Inducible Factor 1 alfa
ATP – Adenosine Triphosphate
HDAC1 – Histone deacetylase 1
Hs90 – Heat Shock Protein 90
GSH - Glutathione Redox System
GST – Glutathione S- Transferase
GPx –Glutathione Peroxidase
ROS – Reactive Oxigen Species
PHD – Propyl Hydrolase
VEGF-A – Vascular Endothelial Growth Factor A

IRF6 – Interferon Regulatory Factor 6
HUC – Hospitais da Universidade de Coimbra
ASC-US – Atypical squamous cells of undetermined significance
LSIL – Low-grade squamous intraepithelial lesion
HSIL – High-grade squamous intraepithelial lesion
NCBI – National Centre for Biotechnology Information
CIN I – Cervical Intraepithelial Neoplasia grade 1
CIN II / CIN III – Cervical Intraepithelial Neoplasia grade II/III
PCR – Polymerase Chain Reaction
EDTA – Ethylene Diamine Tetra Acetate
SNP – Single Nucleotide Polymorphism
NCBI – National Centre for Biotechnology Information
DNA – Ácido desoxiribonucleico

Índice Geral

Índice de Quadros e Tabelas	2
Índice de Figuras.....	3
1. Introdução	5
1.1. Maspina – funções biológicas.....	7
1.1.1. Classificação	7
1.1.2. Localização da maspina	8
1.1.3. Funções de supressão tumoral	9
I. Acção extracelular e pericelular.....	9
II. Acção intracelular	10
III. Novos co-factores e alvos da maspina	11
2. Material e Métodos	15
2.1. Doentes seleccionados para o estudo	15
2.2. Análise imunohistoquímica da maspina	15
2.3. Genotipagem do HPV	16
2.4. Análise de polimorfismos genéticos da maspina	17
2.5. Análise estatística	20
3. Resultados	21
3.1. Expressão da maspina nas lesões cervicais.....	21
3.2. Genotipagem do HPV	28
3.3. Análise de polimorfismos genéticos na maspina	34
3.3.1. Amplificação das zonas codificantes e reguladoras da maspina.	34
3.3.2. Sequenciação e análise dos polimorfismos genéticos.....	35
3.3.3. Análise por região do gene da maspina	36
3.3.4 Caracterização do genótipo por doente.....	45
3.3.5. Correlação genótipo-fenótipo	45
4. Discussão	47
5. Conclusões gerais	51
6. Perspectivas futuras.....	51
Referências Bibliográficas	52

Índice de Quadros e Tabelas

Quadro 1. Resumo das funções da maspina (adaptado de Bailey e al., 2006).	11
Quadro 2. <i>Score</i> de imunomarcção da maspina.....	16
Tabela I. Componentes das reacções de <i>PCR</i> efectuadas.	18
Tabela II. Condições da reacção de <i>PCR</i>	18
Tabela III. Pares de <i>primers</i> e condições utilizadas para amplificar cada segmento do gene da maspina.	19
Tabela IV. Média do <i>score</i> de imunomarcção da maspina nos dois grupos histológicos.	24
Tabela V. Distribuição epitelial da expressão da maspina nas lesões cervicais.	27
Tabela VI. HPV de alto risco mais frequentes nas LSIL e HSIL.	30
Tabela VII. Metade das doentes com HPV de alto risco apresentam $score \leq 4$	31
Tabela VIII. Distribuição da maspina no epitélio nas biópsias com HPV de AR e nas biopsias com HPV de BR ou NI.	33
Tabela IX Genotipagem da maspina por doente.....	45
Tabela X Correlação genótipo – fenótipo nas doentes com LSIL e HSIL.	46

Índice de Figuras

Figura 1. Modelo das funções da maspina baseada na sua localização intra e extracelular (adaptado de Bailey e al., 2006).....	14
Fig. 2. Idade média nos dois grupos histológicos LSIL / CINI e CINII/CINIII.....	21
Fig. 3. Maspina no epitélio cervical normal	22
Fig. 4. Maspina na LSIL e nos koilócitos.....	22
Fig. 5. Maspina nas lesões intra-epiteliais cervicais de alto grau.....	23
Fig. 6. Maspina nas lesões intra-epiteliais cervicais de alto grau: em cima marcada imunomarcção nuclear e em baixo expressão ligeira na camada superficial.....	23
Fig.7. Distribuição da imunomarcção da maspina nas lesões de baixo e alto grau de acordo com o <i>score</i>	24
Fig.8. Expressão celular da maspina.	25
Fig.9. Expressão celular da maspina de acordo com os grupos do <i>score</i> imunohistoquímico.	26
Fig. 10. Distribuição epitelial da maspina de acordo com o <i>score</i> de imunomarcção... ..	28
Fig.11. Distribuição dos tipos de HPV nas lesões cervicais.....	29
Fig. 12. Relação entre tipos de HPV e a imunomarcção da maspina	31
Fig. 13. Distribuição celular da maspina de acordo com as estirpes de HPV.	32
Fig. 14. Distribuição epitelial da maspina de acordo com estirpes de HPV.....	33
Figura 15. Electroforese em gel de agarose dos produtos de <i>PCR</i> obtidos em diferentes condições.	35
Figura 16. Cromatograma da reacção de sequenciação correspondente à alteração observada na sequência do segmento 1 da maspina.. ..	36
Figura 17. Cromatograma da reacção de sequenciação correspondente à alteração observada na sequência do intrão 2 da maspina	37
Figura 18. Cromatograma das reacções de sequenciação correspondentes às alterações observadas no segmento 3 da maspina.	38
Figura 19. Cromatograma da reacção de sequenciação correspondente à alteração observada no segmento 4 da maspina.....	39

Figura 20. Cromatograma da reacção de sequenciação correspondente à alteração observada no segmento 4 da maspina.	39
Figura 21. Cromatogramas das reacções de sequenciação correspondentes às alterações observadas no exão 6 da maspina.	41
Figura 22. Cromatogramas das reacções de sequenciação correspondentes às alterações observadas no 3'UTR do gene da maspina.	44

1. Introdução

O carcinoma epidermóide é o mais frequente dos carcinomas do colo do útero, correspondendo a cerca de 77% do total dos carcinomas cervicais (Jarboe et al., 2004). O cancro invasivo do colo uterino em Portugal apresenta uma das incidências mais elevadas da Europa, correspondendo, em 2002, a 13,5 / 100,000 habitantes com taxa de mortalidade de 4,5 / 100,000.

As lesões cervicais pré-neoplásicas e o carcinoma do colo uterino têm origem numa zona do epitélio designada por zona de transformação, onde ocorre um processo contínuo e progressivo de transformação do epitélio cilíndrico em epitélio escamoso. A infecção deste epitélio pelo HPV constitui um factor determinante no desenvolvimento das lesões cervicais pré-neoplásicas e do carcinoma do colo uterino, mas isolada não é condição suficiente para a evolução maligna (Wong et al., 2004). Mais de 200 tipos de HPV foram identificados e, aproximadamente 40, são responsáveis pela infecção do tracto genital inferior feminino. São agrupados em HPV de alto e baixo risco de acordo com a respectiva frequência de associação com o carcinoma e displasias graves versus lesões cervicais ditas de baixo grau. A relação causal entre o carcinoma do colo e a infecção por HPV emerge de estudos epidemiológicos e estudos moleculares do potencial oncogénico viral. Embora o DNA do HPV de alto risco seja detectado em quase todos os casos de lesões cervicais de alto grau ou carcinoma, não constitui um marcador específico destas lesões dado existir uma proporção significativa de mulheres com epitélio cervical normal e com a presença de HPV de alto risco (Jarboe et al., 2004).

Uma série de factores é responsável pela regressão ou persistência da infecção ou pela progressão para lesões precursoras do cancro invasivo do colo uterino. Estes factores intervindo na carcinogénese cervical dependem do HPV, da célula epitelial infectada, do hospedeiro e da interacção entre o vírus e o hospedeiro.

Os estudos moleculares têm demonstrado que o desenvolvimento do carcinoma do colo do útero ocorre após uma série de lesões genéticas cumulativas nas células epiteliais do colo uterino, resultantes dos efeitos directos das oncoproteínas do HPV de alto risco, nomeadamente, das oncoproteínas decorrentes da expressão dos genes E6 e E7. Quando ocorre a integração do genoma do HPV de alto risco nas células epiteliais

cervicais, há perda da função supressora da região E2 sobre as E6 e E7. As oncoproteínas produtos dos genes E6 e E7 inactivam a p53 e pRb, respectivamente, vias importantes na regulação do ciclo celular, nomeadamente, na reparação do DNA celular quando lesado ou na indução da apoptose quando existe uma lesão genética grave (Wang e Hildesheim, 2003). A oncoproteína resultante do gene E6 aumenta a degradação da p53 conduzindo a uma limitação da capacidade da célula hospedeira em evitar o crescimento na presença de lesão do DNA. A oncoproteína resultante do gene E7 intervem na via da pRb bloqueando a sua função de repressão da transcrição.

A investigação tem vindo a demonstrar que as alterações moleculares induzidas pelas oncoproteínas estão relacionadas com vias de sinalização para a proliferação celular, diferenciação e potencial metastático (Waggoner e Chernicky, 2003). A utilização deste conhecimento para se obterem biomarcadores e/ou alvos terapêuticos poderá teoricamente prever o comportamento biológico da doença e a necessidade de intervenção clínica ou vigilância continuada após medidas de prevenção ou medidas terapêuticas (Padilla-Paz L. A., 2005).

Como ainda não foram identificados biomarcadores específicos das lesões displásicas graves e do carcinoma do colo uterino, o diagnóstico tem sido baseado em exames morfológicos e histológicos e o prognóstico em dados clínicos (Jarboe et al., 2004).

Vários potenciais biomarcadores das lesões displásicas do colo uterino são alvo de estudos *in vivo* e *in vitro*. A relevância clínica da mspina tem sido extensamente investigada desde a sua descoberta em 1994 nas células mioepiteliais da mama, onde se verificou haver forte expressão nas células epiteliais e mioepiteliais normais estando, praticamente, ausente nos carcinomas mamários invasivos e metastáticos (Zou et al., 1994; Lele et al., 2000). Verifica-se um melhor prognóstico nos carcinomas espinhocelulares orais quando há expressão da mspina e, no carcinoma da próstata, a perda da expressão da mspina correlaciona-se com tumores em estádios avançados e com maior indiferenciação histológica (Pierson et al., 2002). Doentes com carcinoma da próstata que ainda expressem algum grau de mspina apresentam maior sobrevivência livre de doença (Machtens et al., 2001). Tanto no carcinoma da mama como no carcinoma da próstata, a expressão da mspina pode ser activada directamente pela p53 ou inactivada pela hormonoterapia (Zou et al., 2000).

Se bem que os estudos tenham mostrado que a perda de expressão da maspina está muitas vezes associada à fase de invasão dos tumores da próstata, alguns autores estudaram a expressão da maspina nas fases iniciais do desenvolvimento do carcinoma da próstata e concluíram que as neoplasias intra-epiteliais e os carcinomas da próstata de baixo grau mostram altos níveis de expressão enquanto que, os carcinomas de alto grau apresentam níveis significativamente mais baixos (Pierson et al., 2002). Foi demonstrado que em linhas celulares de carcinoma da próstata a p53 aumenta a actividade de transcrição da sequência promotora da maspina (Zou et al.) e, que em biopsias de carcinoma da próstata, a expressão da maspina está inversamente correlacionada com a acumulação de mutantes da p53 (Machtens et al.).

Com este trabalho pretende-se estudar a expressão da maspina em lesões pré-neoplásicas do colo uterino e identificar o tipo de associação existente entre a expressão e distribuição da maspina e outros marcadores associados à neoplasia do colo uterino como os HPV.

1.1. Maspina – funções biológicas

1.1.1. Classificação

A maspina foi pela primeira vez identificada em 1994 nas células epiteliais mamárias normais (Zou e al., 1994). É uma proteína com 376 aminoácidos cuja sequência apresenta homologia com a superfamília das serpinas inibidoras da protease serina. É codificada por genes supressores tumorais da classe II, localizados no cromossoma 18 (18q21.3 – q23) e ao longo do qual se encontram outro genes da serpina como os dos antigéneos 1 e 2 do carcinoma das células escamosas (SCCA1 e SCCA2) e Plasminogen Activator Inibitor 1 e 2 (PAI 1 e PAI 2) (Schneider et al., 1995). Embora integrada no grupo das serpinas com função inibidora das proteases através da *Serpine Reactive Site Loops* (RSL), a maspina é classificada como serpina não inibidora uma vez não lhe serem conhecidas proteases alvo (Bailey et al., 2006; Al-Ayyoubit et al., 2004).

1.1.2. Localização da maspina

A maspina é isolada das fontes biológicas como um monómero presente no citoplasma celular, núcleo, estando ligada às proteínas da superfície celular e, ainda, constituindo um produto de secreção das células (Pemberton et al., 1997; Shao et al., 1998; Katz e Taichman, 1999; McGoWen et al., 2000; Chim et al., 2005; Lonardo et al., 2006).

Dependendo da célula, a maspina apresenta um padrão de distribuição diverso. Nas células epiteliais mamárias tem uma localização predominantemente citoplasmática e, é nuclear, nas células mio-epiteliais (Zou et al., 1994; Pemberton et al., 1997; Nicolai Maass et al., 2002). No carcinoma do ovário a localização citoplasmática está associada a pior prognóstico enquanto que, uma localização nuclear é indicativa de lesões tumorais menos agressivas (Sood et al., 2002). No carcinoma do pulmão de células não pequenas a localização nuclear está igualmente associado a melhor prognóstico (Heighway et al., 2002; Smith et al., 2003). No adenocarcinoma do pulmão a maspina nuclear está significativamente correlacionada com baixo grau histológico, baixas taxas de proliferação, ausência de invasão e p53 negativa. Assim, a localização nuclear da maspina poderá estratificar subtipos de tumores com aspectos clínico-patológicos favoráveis sugerindo um papel importante da maspina nuclear na supressão tumoral (Lonardo et al., 2006).

Visto que a perda da expressão da maspina está associada a fenótipos mais agressivos dos tumores, o aumento paradoxal da maspina citoplasmática nas fases iniciais da progressão tumoral, poderá mostrar um efeito supressivo sub-ótimo na transição das doenças não invasivas para as invasivas (Sheng, 2004; Lockett et al., 2006).

A compartimentalização itinerante associada ao perfil bifásico da expressão na fase inicial do desenvolvimento tumoral, sugere que a maspina terá funções biológicas versáteis sob diferentes influências fisiopatológicas (Lockett e al., 2006). Verificam-se altos níveis de maspina nos compartimentos nuclear e citoplasmático em células epiteliais atróficas da próstata, sendo que a atrofia é considerado um estado de *stress* ligado à inflamação crónica. *In vitro*, a adição de p53, agentes causadores de alterações do DNA, drogas citotóxicas e outros, activam a expressão da maspina (Li et al., 1998; Mueller et al., 1998; Zou et al., 2000; Khalkhali-Ellis e Hendrix, 2003).

1.1.3. Funções de supressão tumoral

A maspina tem sido consistentemente associada à supressão de fenótipos tumorais agressivos, à inibição da invasão e motilidade celulares *in vitro* e à inibição do crescimento tumoral e metastização em modelos animais de experimentação (Sheng, 2004; Cher et al., 2003).

Os vários estudos clínicos e experimentais demonstram que as acções da maspina dependem da sua localização celular e dos seus potenciais alvos.

I. Acção extracelular e pericelular

A motilidade e invasão celulares são processos que requerem formação dinâmica de novas adesões e perturbação da interacção célula-matriz (Zamir e Geiger, 2001). *In vitro* foi demonstrado que a maspina provoca adesão celular à fibronectina da matriz extracelular (MEC) com aumento consequente dos contactos de adesão focal (CAF) (Seftor et al., 1998; Odero-Marah et al., 2003). Estudos com células de carcinoma MDA-MB-435 que foram tratadas com maspina recombinante (rMaspina) mostraram aumentos de integrinas $\alpha 5$ e $\alpha 3$ e de RNAm da integrina $\alpha 5$ (Seftor et al., 1998). Esta alteração do perfil celular das integrinas é acompanhada pelo aumento da adesão à fibronectina e redução da invasão através da matriz fibronectina/gelatina. A adição de anticorpo dirigido à integrina $\alpha 5 \beta 1$, uma clássica ligação integrina-fibronectina, diminui a resposta induzida pela rMaspina. É possível que ocorra internalização da maspina e se iniciem, então, mecanismos de sinalização *inside-outside* que levem às modificações na dinâmica dos CAF (Seftor et al., 1998).

Nas células tumorais de cultura MDA-MB-231 com rMaspina verifica-se diminuição da actividade de Rac1 e aumento de PI3K e ERK1/2 com diminuição consequente da motilidade e aumento da adesão celular. Estas alterações acompanham-se de aumento das adesões focais e de fibras de stress (Odero-Marah et al., 2003).

Outro mecanismo anti-invasão da maspina parece ser intermediado pelo complexo da superfície celular uPA/uPAR (urokinase plasminogen activator/urokinase plasminogen activator receptor). Este complexo está normalmente envolvido na conversão do plasminogénio em plasmina, uma protease capaz de provocar a clivagem de várias proteínas da MEC como a fibronectina, fibrina e laminina. Se bem que a maspina não iniba directamente a actividade da uPA, demonstrou-se que provoca a

redução do complexo uPA/uPAR da superfície celular através da sua internalização (Biliran et Sheng, 2001; Yin et al., 2006).

Em resumo, podemos afirmar que a maspina extracelular pode regular especificamente a apresentação do complexo uPA/uPAR na superfície celular, inibir a dinâmica da MEC e, conseqüentemente, estabilizar os CAF dependente das interações célula-matriz.

A angiogénese é fundamental na carcinogénese uma vez que a rápida proliferação tumoral requer aumento do aporte sanguíneo para manter o nível acelerado de crescimento celular. Vários estudos mostram que a maspina pode ter uma função como inibidora da angiogénese. Tanto a rMaspina como a maspina segregada podem impedir a migração de células endoteliais de cultura perante bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) e VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Zhang et al., 2000b; Nickoloff et al., 2004). *In vivo* verifica-se, igualmente, uma redução da densidade dos microvasos nos tumores (Zhang et al., 2000b). Estudos recentes indicam que a localização nuclear da maspina nas células do carcinoma seroso do ovário está associada à redução de marcadores da angiogénese como a VEGF. Desta forma, coloca-se a hipótese de a maspina exercer os efeitos anti-angiogénicos ao nível do núcleo independentemente da sua função na superfície celular (Solomon et al., 2006).

II. Acção intracelular

Os estudos sobre a maspina evidenciam que os seus efeitos no crescimento tumoral se devem, em grande parte, ao aumento da apoptose (Zhang et al., 2000a; Shi et al., 2002, 2003). Estes efeitos parecem mediados pela expressão aumentada das proteínas pró-apoptóticas Bax (Liu et al., 2004a). Sob estímulos apoptóticos há uma translocação da Bax do citoplasma para as mitocôndrias, havendo aumento significativo da libertação de citocromo-c, aumento da actividade das caspase-9 e caspase-3, da fragmentação nuclear, efeitos que podem ser parcialmente abolidos pelo inibidor específico da caspase-9.

Foi demonstrado que é a maspina intracelular e, não a maspina secretada ou a adicionada ou exógena através da rMaspina, a que sensibiliza as células para a apoptose induzida por drogas *in vitro* (Jiang et al., 2002; Liu et al., 2004). Enquanto a maspina extracelular depende da RSL intacta para inibir o complexo da superfície

celular UPA/uPAR, a mobilidade celular e a invasão tumoral, a maspina intracelular necessita dos domínios N-terminal e C-terminal para a resposta apoptótica celular (Jiang et al., 2002). No Quadro 1. são resumidas as principais funções da maspina.

Quadro 1. Resumo das funções da maspina (adaptado de Bailey e al., 2006).

	Mecanismos	Efeitos
Metastização	Alteração do perfil da Integrina	Aumento da adesão celular à Fibronectina
	Diminuição da actividade da uPA/uPAR	Redução da actividade da Plasmina
	Inibição da actividade da Racl	Redução da mobilidade celular
	Estimulação das vias PI3K/ERK	Aumento da adesão celular por aumento da formação e adesão focal de fibras de <i>stress</i>
Angiogénese	Desconhecido	Bloqueio da migração endotelial
	Desconhecido	Diminuição da densidade de microvasos associada à redução de neovascularização
Apoptose	Activação da via das caspases	Aumento da sensibilidade à apoptose induzida pela staurosporina
	Sinalização parácrina	A maspina segregada pelas células mio-epiteliais induz a apoptose nas células do cancro da mama

III. Novos co-factores e alvos da maspina

A ubiquidade na localização da maspina sugere o seu envolvimento em múltiplos processos de supressão tumoral.

A investigação tem procurado encontrar proteínas *alvo* da acção da maspina não tendo, contudo, sido possível estabelecer um modelo molecular. O modelo da “serpina clássica” está a tornar-se insuficiente para explicar as funções biológicas multifacetadas da maspina. À luz das mais recente investigação surgiu o novo paradigma da maspina a de agir como “*chaperone*” para restaurar uma resposta celular normal aos sinais de *stress* do meio envolvente. Ainda não é possível conhecer com clareza a regulação temporal e espacial das interacções da maspina com cada proteína da resposta ao *stress* celular (Lockett et al., 2006).

A maspina é a única serpina pró-apoptose entre todas as serpinas implicadas na regulação da apoptose. Especula-se que a maspina poderá regular a sensibilidade apoptótica da célula através da Hs90. Esta proteína está altamente expressa em vários tumores e está relacionada com proteínas oncogénicas como c-Src, AKT, FAK, EGFR, MEK, c-Raf, HIF-1 α (Beliakoff e Whitesell, 2004; Citri et al., 2004; Sreedhar et al., 2004; Zhang e Burrows, 2004). Estas proteínas estando ligadas à Hs90 estão protegidas de um processo de hidrólise ATP dependente. Caso a Hs90 seja inibida estas proto-oncoproteínas ficam sujeitas à degradação com mediação proteasómica, aumentando a sensibilidade celular para apoptose.

A evidência da correlação entre, por um lado, a maspina e fenótipos mais favoráveis de carcinomas e melhores taxas de sobrevivência e, por outro, relação entre a maspina e a indução da expressão da Bax (Liu et al., 2004) e p21 (Shao et al., 1998), sugere que pode participar especificamente na regulação de transcrição. Os estudos sugerem que a maspina interage directamente com a desacetilase 1 da histona (HDAC1), a mais abundante e importante HDAC, que hidrolisa os resíduos N-acetil lisina na histona e outras proteínas. A desacetilação da histona mediada pela HDAC1 é responsável pela condensação da cromatina não permitindo o acesso dos factores de transcrição e, assim, reprime a expressão genica da Bax, p21, p27 e citoqueratinas 18. Dados consistentes com o efeito inibitório da maspina sobre HDAC1, são os resultados de estudos que mostram a indução da expressão da Bax, p21 e marcador CK18 nas células epiteliais do cancro da próstata.

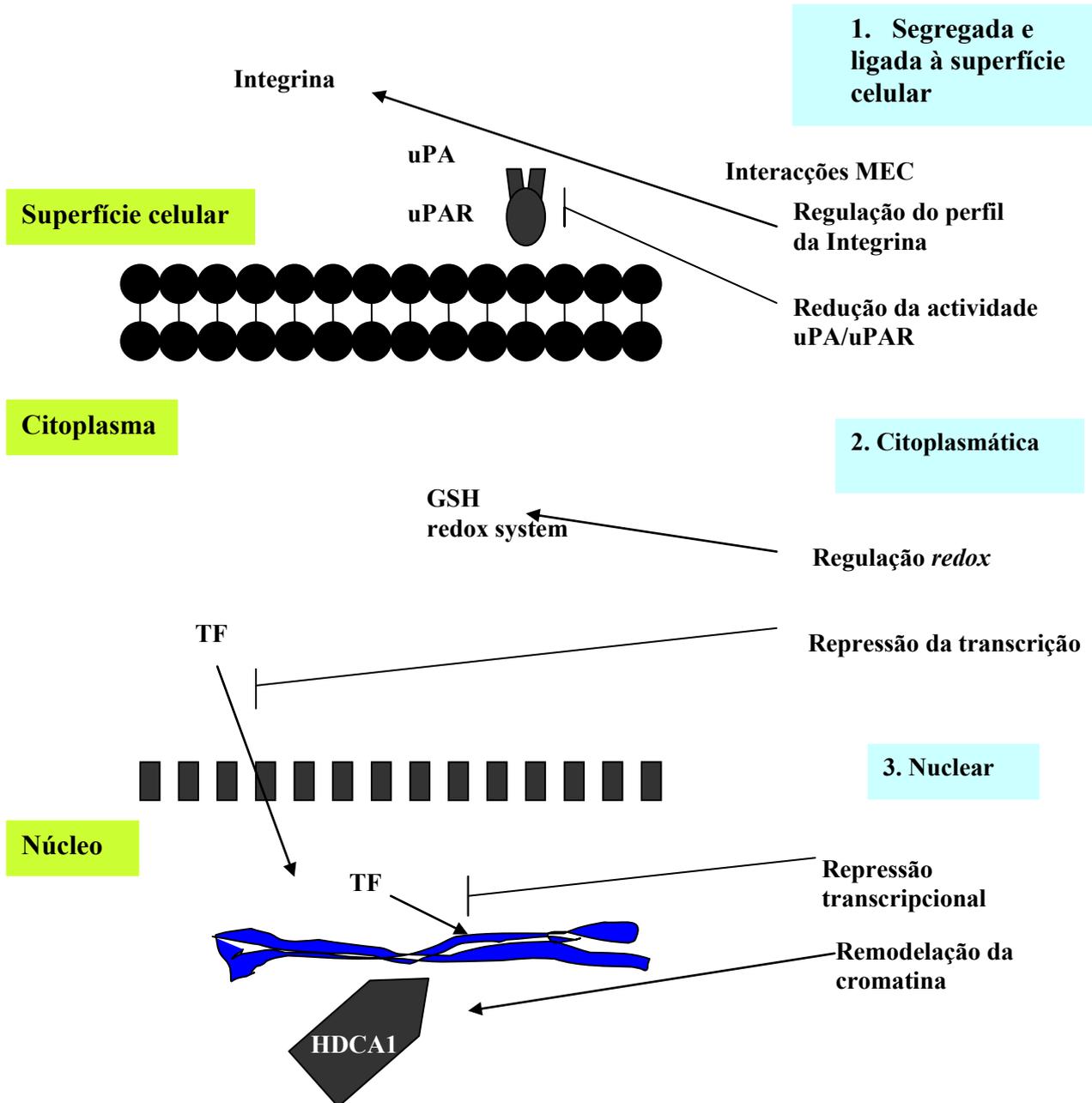
A maspina pode também interagir com proteínas implicadas nos mecanismos de resposta ao *stress* oxidativo, nomeadamente, com enzimas do glutathione (GSH) redox system, a glutathione S-transferase (GST) e a glutathione peroxidase (GPx) (Caleb Bailey et al., 2006). Este sistema é responsável pela manutenção da integridade celular e protecção da célula contra as lesões oxidativas. A maspina ao interagir com GST e GPx pode ter um papel importante na GSH redox system. Ao aumentar a actividade da GST, a maspina reduz a quantidade de espécies reactivas ao oxigénio (ROS) geradas pelo *stress* oxidativo, os quais são responsáveis pelas lesões do DNA, proteínas e lípidos (Cook et al., 2004; Pervaiz e Clement, 2004; Shi et al., 2004). ROS também inactiva PHD (prolyl hydrolase) que, por sua vez inactivada, leva à libertação de HIF-1 α , importante para a transcrição da VEGF-A, Factor de Crescimento do Endotélio Vascular

(Dachs e Tozer, 2000). Uma vez que a geração de ROS está ligada à angiogénese induzida pela hipóxia, a regulação da GST pela maspina pode constituir um outro mecanismo das propriedades anti-angiogénicas da maspina.

Outra proteína cuja interacção com a maspina poderá regular os processos de transcrição é Interferon Regulatory Factor 6 (IRF6) (Bailey et al., 2005), que para além do papel nas respostas imunitárias de defesa está ligado aos processos de apoptose, supressão tumoral e desenvolvimento embrionário (Tanaka et al., 1994; Kondo et al., 2002). A interacção maspina-IRF6 ocorre no citoplasma das células epiteliais normais da mama e os níveis de IRF6 diminuem tal como os valores da maspina, nos cancros da mama em progressão. Parece haver um efeito de inibição do IRF6 pela maspina que resultará da fixação do IRF6 no citoplasma evitando a sua translocação para o núcleo celular (Bailey et al., 2006) e, desta forma, reprimindo a transcrição.

Tendo em consideração os mais recentes estudos sobre a maspina é possível representar um possível modelo molecular das funções e regulação da maspina de acordo com a Figura 1.

Figura 1. Modelo das funções da maspina baseada na sua localização intra e extracelular (adaptado de Bailey e al., 2006).



uPA – urokinase plasminogen activator; uPAR – uPA receptor; MEC – matriz extracelular; GSH – glutathione; TF – transcription factor; HDCA1 – histone deacetylase -1.

2. Material e Métodos

2.1. Doentes seleccionados para o estudo

Em 45 doentes enviadas ao Serviço de Ginecologia dos HUC pelos médicos assistentes, entre 2006 e 2008, por lesões de ASC-US, LSIL e HSIL na citologia cervical (classificação de Bethesda, 2001), foi efectuada colposcopia com biópsias dirigidas às lesões, sendo um fragmento fixado em formol e enviado para o Serviço de Anatomia Patológica dos HUC para ser incluído em blocos de parafina e serem realizados estudos histológicos de confirmação diagnóstica e estudos imunohistoquímico para a avaliação da expressão e distribuição da maspina. Outro fragmento foi incluído em O.C.T™ (Tissue-Tek®) e, posteriormente, armazenado em arca a -80° C para a genotipagem do HPV.

As biópsias incluíram 31 lesões intra-epiteliais de baixo grau (LSIL) e 14 de alto grau (HSIL). O diagnóstico histológico das lesões cervicais seguiu a classificação de Bethesda de 2001.

A cada doente com lesões cervicais e em 35 mulheres sem história de patologia cervical e oncológica, foi ainda colhido sangue periférico para análise de polimorfismos genéticos da maspina.

2.2. Análise imunohistoquímica da maspina

A análise da distribuição da maspina nas lesões cervicais foi efectuada por imunohistoquímica a partir do material biológico conservado em blocos de parafina e seccionados em 5 µm. Para o efeito, utilizou-se o anticorpo monoclonal específico da maspina disponível comercialmente com o nome de Maspin Ab-1 (clone EA W24) ® da ThermoScientific com controlo positivo testado nas células da próstata normal. Foi seguido o método da Streptavidina – Biotina / HRP na preparação do material biológico que consistiu em desparafinar e hidratar as amostras em água destilada com recuperação antigénica através de microondas, em tampão EDTA pH 8.0, durante 35 minutos a 102°C seguida de lavagem em TBS; inibição da peroxidase endógena com Envision Flex Peroxidase-Blocking durante 5 minutos seguindo-se nova lavagem em TBS; incubação no soro primário anti Maspina Ab-1, com diluição de 1/20, durante 60 minutos com nova lavagem em TBS; incubação secundária em Envision.Flex /HRP durante 30

minutos e lavagem em TBS; revelação da marcação Ag / Ac com DAB durante 5 minutos, reforço da revelação com nova passagem por DAB por mais 5 minutos, lavagem em água corrente. Finalmente, procedeu-se ao contraste Hematoxilina de Gill durante 3 minutos, ao azular em água corrente durante 5 minutos e desidratação e montagem em meio sintético.

A expressão da maspina foi avaliada por dois anatomopatologistas e a imunomarcção foi considerada positiva quando surgiu marcação granular no citoplasma e/ou núcleo, tendo sido elaborado um *score* de imunomarcção usando uma escala de 0-3 baseada na percentagem de células positivas, intensidade e uniformidade da marcação (Quadro 2).

Quadro 2. *Score* de imunomarcção da maspina

	0	1	2	3
% de células	<10%	10-25%	25-50%	>50%
Intensidade	Negativa	Fraca	Moderada	Forte
Uniformidade	Não	Sim		

2.3. Genotipagem do HPV

O DNA genómico dos HPV foi isolado a partir das biópsias das lesões cervicais congeladas a -80°C e o DNA viral foi posteriormente amplificado por *PCR* de acordo com o descrito no manual do fabricante GenoID® The HPV Diagnostics Company.

A amplificação por *PCR* do HPV segundo a GenoID® permite identificar os seguintes genótipos de HPV, considerando que alterações significativas do genoma do HPV podem originar resultados falsos-negativos:

- Baixo Risco (BR): 6, 11, 42, 44/55;
- Alto Risco (AR): 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68;
- HPV de Risco não Classificado: 2, 3, 7, 10, 13, 26, 27, 28, 29, 30, 34, 40, 53, 54, 57, 61, 67, 70, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 85, 89, 90, 91.

2.4. Análise de polimorfismos genéticos da maspina

O DNA de algumas amostras foi isolado a partir de 500 µl de sangue com o kit DNA Purification kit, ATC-D48BBC (Gentra), no aparelho automático Autotech - Automated Purification Instrument (Gentra). O DNA das restantes amostras foi isolado a partir de 200 µl de sangue com o kit DNA Blood mini kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Dada a baixa concentração de DNA obtida para algumas amostras, foi necessário proceder à sua concentração por evaporação no SpeedVAC (DNA 120, SpeedVAc Concentrator, Thermo, Electron Corporation).

A determinação da concentração de DNA das amostras e dos produtos de PCR após purificação foi realizada por quantificação espectrofotométrica a 260 nm no aparelho ND-1000 da NanoDrop.

A amplificação dos exões do gene da maspina foi efectuada por primers a flanquear cada zona exónica e o 3'UTR, num total de 10 segmentos. O exão 6 foi dividido em duas zonas sobreponíveis dada a sua grande dimensão. O 3' UTR foi dividido em três zonas sobreponíveis. Os primers foram desenhados de acordo com a sequência publicada no NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov) para o gene da maspina, localizado no cromossoma 18, referência NC_000018.8, nucleótido 59295199 ao 59323297 e da informação do RNAm ref. 142377273.

Cada reacção de PCR foi efectuada em volumes de 50 µl por adição dos componentes constantes na tabela I. A enzima Fidelity Taq DNA polimerase (USB, GE Healthcare) foi utilizada nas reacções por apresentar maior grau de fiabilidade na introdução dos nucleótidos. A extensão das cadeias de DNA decorreu a 68°C, de acordo com as indicações do fabricante.

Tabela I. Componentes das reacções de PCR efectuadas.

Reagentes	Volume para 50 µl	Concentração final
Tampão 10X	5 µl	1X
MgCl ₂ 25 mM	2 µl	1 mM
dNTP 5 mM	2 µl	200 µM
Primers 20µM	1,2 µl	0,5 µM
FideliTaq	0,3 µl	1,5 U
DNA molde	Variável	200 ng
Água Milli-Q estéril	perfazer até 50 µl	--

As reacções de PCR foram feitas num termociclador MyCycle (BioRad) de acordo com o programa descrito na tabela II. A temperatura de *annealing* variou de acordo com o conjunto de primers a usar para a amplificação de cada região.

Tabela II. Condições da reacção de PCR.

Passos	Condições	Nº ciclos
Desnaturação inicial	95°C – 5 min	1
Desnaturação	95°C – 35s	40
<i>Annealing dos primers</i>	Variável – 35s	
Extensão	68°C – 50s	
Extensão final	68°C – 10 min	1

Os *primers* foram seleccionados para flanquear cada exão e zonas reguladoras do gene da maspina utilizando a sequência publicada como base (Tabela III.).

Tabela III. Pares de *primers* e condições utilizadas para amplificar cada segmento do gene da maspina.

Designação	Segmento a amplificar	Sequência	T _m (°C)	T _a (°C)	Segmento (bp)
P1Masp-F	1	5'-GGCAGAATGCAGTTGAGAAG-3'	60	56	310
P1Masp-R		5'-GGCACTGCCTATGGGTTC-3'	58		
P2Masp-F	2	5'-GGCAGGAGGAGTCTGTATGC-3'	64	60	308
P2Masp-R		5'-GCATGAAAATGCCACTCCTTG-3'	62		
P3Masp-F	3	5'-CACTGACTTCTACATGAGG-3'	56	54	448
P3Masp-R		5'-GAATTGCCAGAAATCCAAG-3'	58		
P4Masp-F	4	5'-CAGGCCTTACATGGTGTGAC-3'	62	58	334
P4Masp-R		5'-GCCCCACTCTGTCCCTATC-3'	62		
P5Masp-F	5	5'-GCAGTCCAAATTTCCCTTTTAC-3'	64	58	353
P5Masp-R		5'-GAAAGGCCCCAGAAAGAACC-3'	62		
P6Masp-F	6	5'-GCTTTGAAGCTGGGCTTATC-3'	60	58	382
P6Masp-R		5'-CCTGGCACCTCTATGGAATC-3'	62		
P7Masp-F	6	5'-CTGGAATGTCAGAGACCAAG-3'	60	58	350
P7Masp-R		5'-GACAAGTACTGGCGGCTTC-3'	60		
P8Masp-F	3'UTR	5'-CTGTGGATGCCGATTTCTG-3'	58	56	491
P8Masp-R		5'-GCCAGGGCTTAACATAAGG-3'	58		
P9Masp-F	3'UTR	5'-CCTTATGTTAAGCCCTGGC-3'	62	56	466
P9Masp-R		5'-CTAGTGCCAACCAAATGACC-3'	60		
P0Masp-F	3'UTR	5'-CTGAAATGCAAGACCCCAAG-3'	60	56	460
P10Masp-R		5'-CAATGCAGGTCAAGGAAGAG-3'	60		

Para algumas amostras, o tamanho dos fragmentos obtidos por amplificação das diferentes zonas do gene da maspina foi avaliado pela observação de 5 µl de cada reacção de PCR em electroforese em gel de agarose a 1,5% em TAE (40 mM Tris, 1 mM

EDTA, 0,11% de ácido acético glacial). As bandas de DNA foram visualizadas por coloração com brometo de etídeo.

As restantes amostras foram analisadas num sistema de electroforese automático, Labchip (Caliper).

Os produtos de PCR foram purificados antes da sequenciação utilizando o *kit* comercial High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science) de acordo com as instruções do fabricante. Este *kit* elimina componentes da reacção de PCR que poderão interferir com as reacções de sequenciação, tais como sais, nucleótidos e *primers* não incorporados. Baseia-se na ligação do DNA a fibras de vidro na presença de tiocianato de guanidina, um sal caotrópico.

Após a purificação procedeu-se à quantificação do DNA nas amostras por espectrofotometria a 260 nm, utilizando o NanoDrop.

As amostras foram sequenciadas com recurso à tecnologia de Sanger, utilizando os *primers forward* e *reverse* empregues nas reacções de PCR.

2.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com programa SSPS 13.0 para o Windows. Utilizaram-se t-test para variáveis independentes, os testes Chi-Square, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para avaliar diferenças entre variáveis não paramétricas. Consideraram-se diferenças significativas se $p < 0,05$.

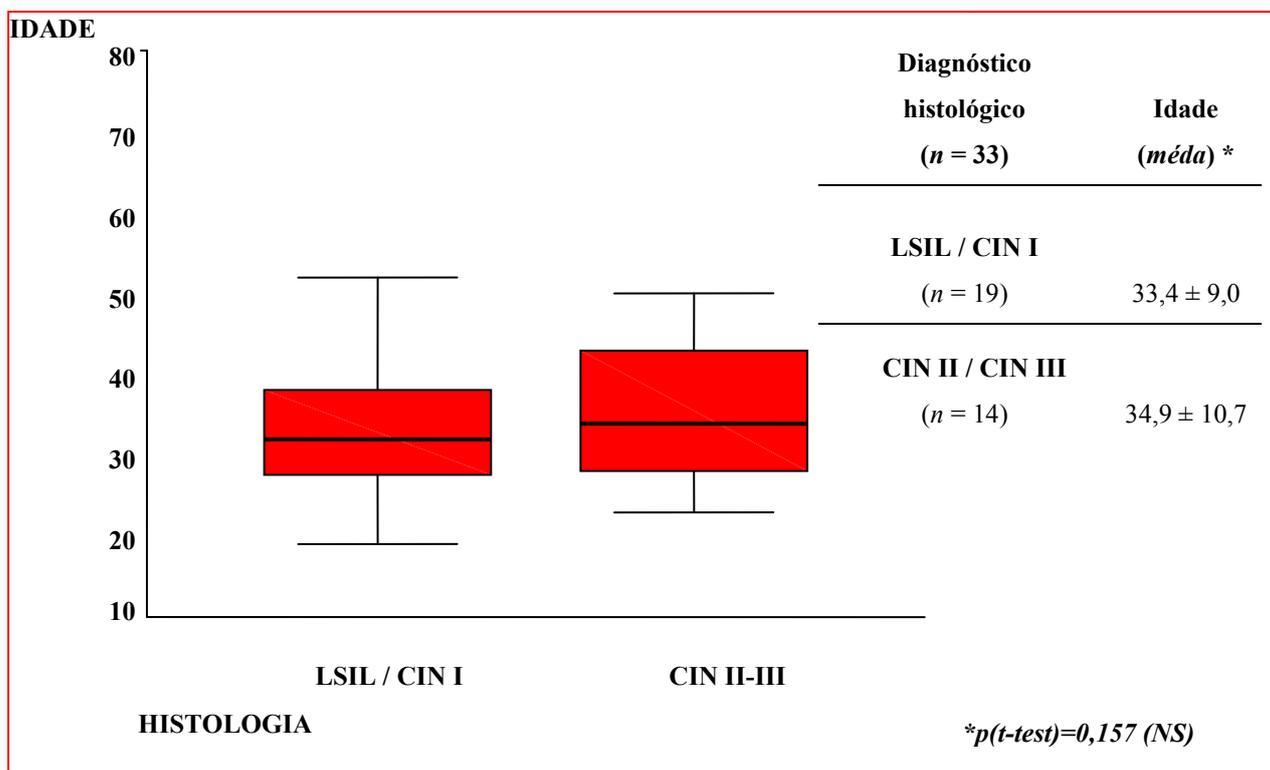
3. Resultados

3.1. Expressão da maspina nas lesões cervicais

A distribuição da maspina nas lesões cervicais foi analisada por imunohistoquímica em 33 doentes, 19 com biópsias confirmando LSIL / CIN I com sinais de infecção por HPV e 14 com lesões CIN II / III. A exiguidade das amostras obtidas em 12 biópsias não permitiu realizar análises imunohistoquímicas na totalidade dos doentes envolvidos no presente estudo.

A média de idades das doentes nas duas populações não apresentava diferenças significativas, ocorrendo um mínimo de 19 e um máximo de 73 anos (Fig. 2).

Fig. 2. Idade média nos dois grupos histológicos LSIL / CINI e CINII/CINIII.



A imunomarcação da maspina foi identificada no epitélio cervical normal como uma granulação de cor acastanhada no citoplasma e núcleo celular (Fig. 3) mais evidente nas células das camadas basal e intermédia do epitélio. Este padrão foi também mais frequente nas lesões intra-epiteliais de baixo grau, realçando-se neste caso, a

imunomarcção ao nível da camada superficial, nomeadamente, nos núcleos dos koilócitos com expressão marcada da mspina na camada superficial (Fig. 4).

Fig. 3. Maspina no epitélio cervical normal

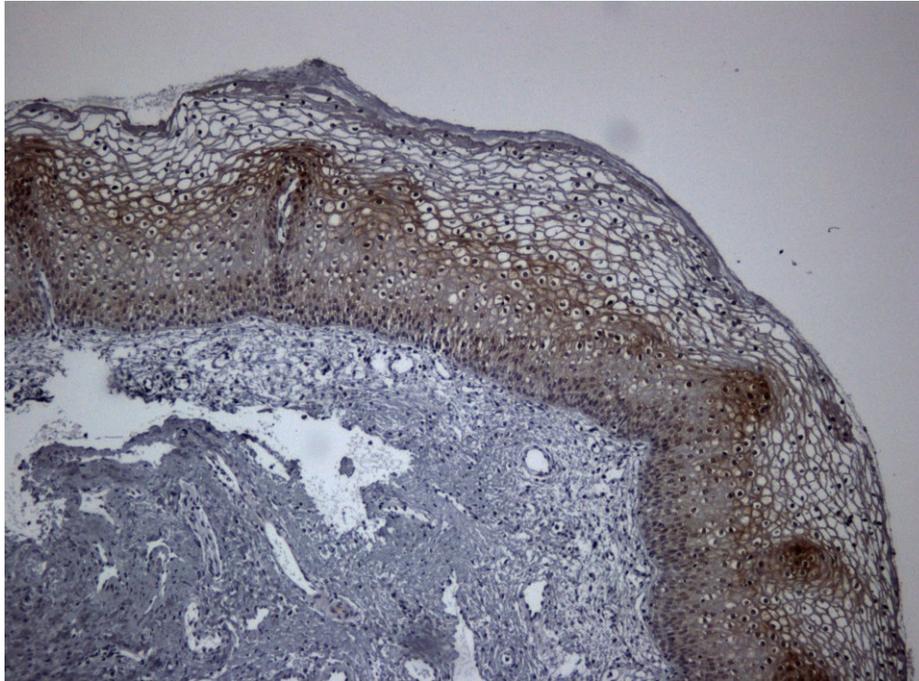
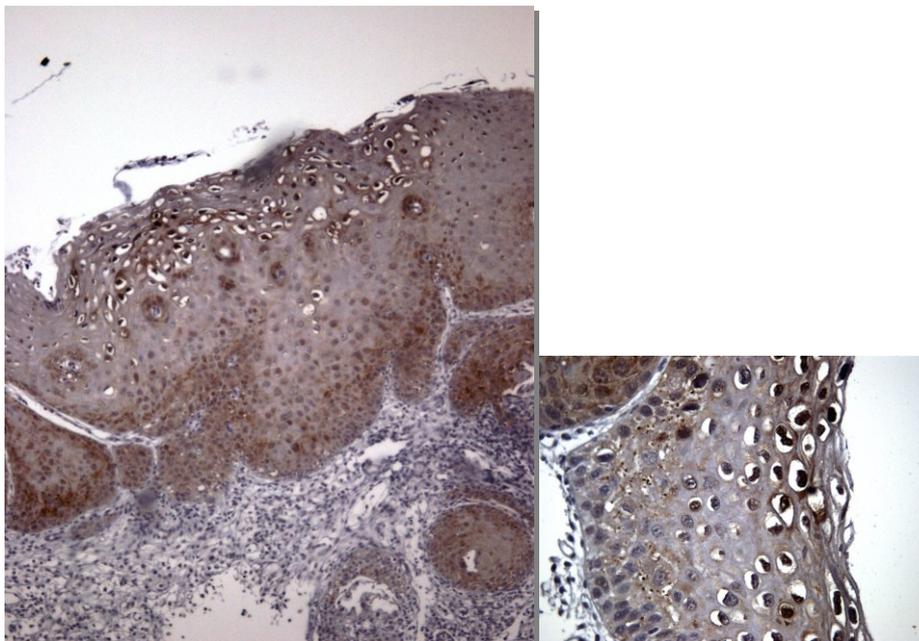


Fig. 4. Maspina na LSIL e nos koilócitos



Nas lesões intra-epiteliais de alto grau a expressão da maspina foi variável com realce para a maior imunomarcção nuclear. Foi possível observar desde a ausência de expressão da maspina na camada basal à imunomarcção em todas as camadas do epitélio (Fig. 5 e Fig. 6).

Fig. 5. Maspina nas lesões intra-epiteliais cervicais de alto grau.

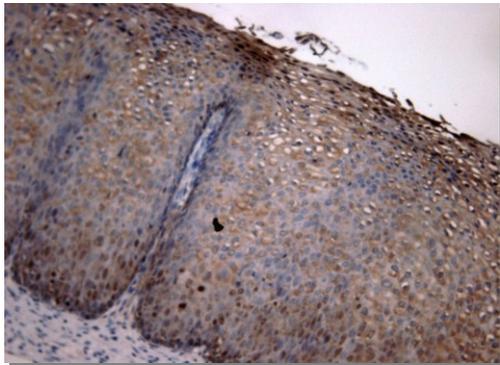
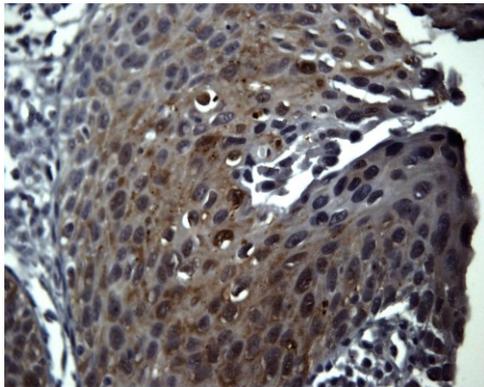
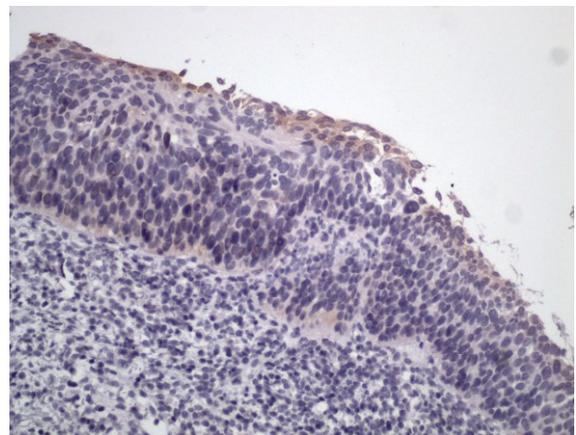
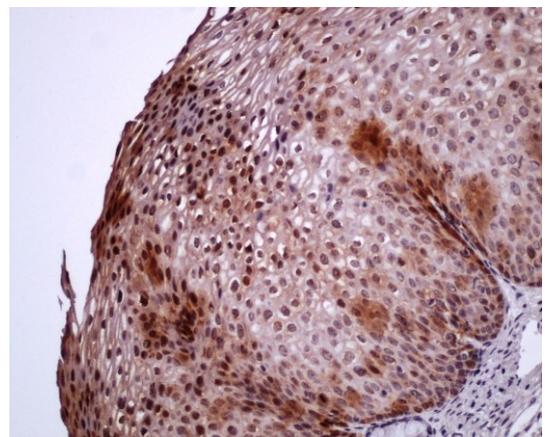


Fig. 6. Maspina nas lesões intra-epiteliais cervicais de alto grau: em cima marcada imunomarcção nuclear e em baixo expressão ligeira na camada superficial.



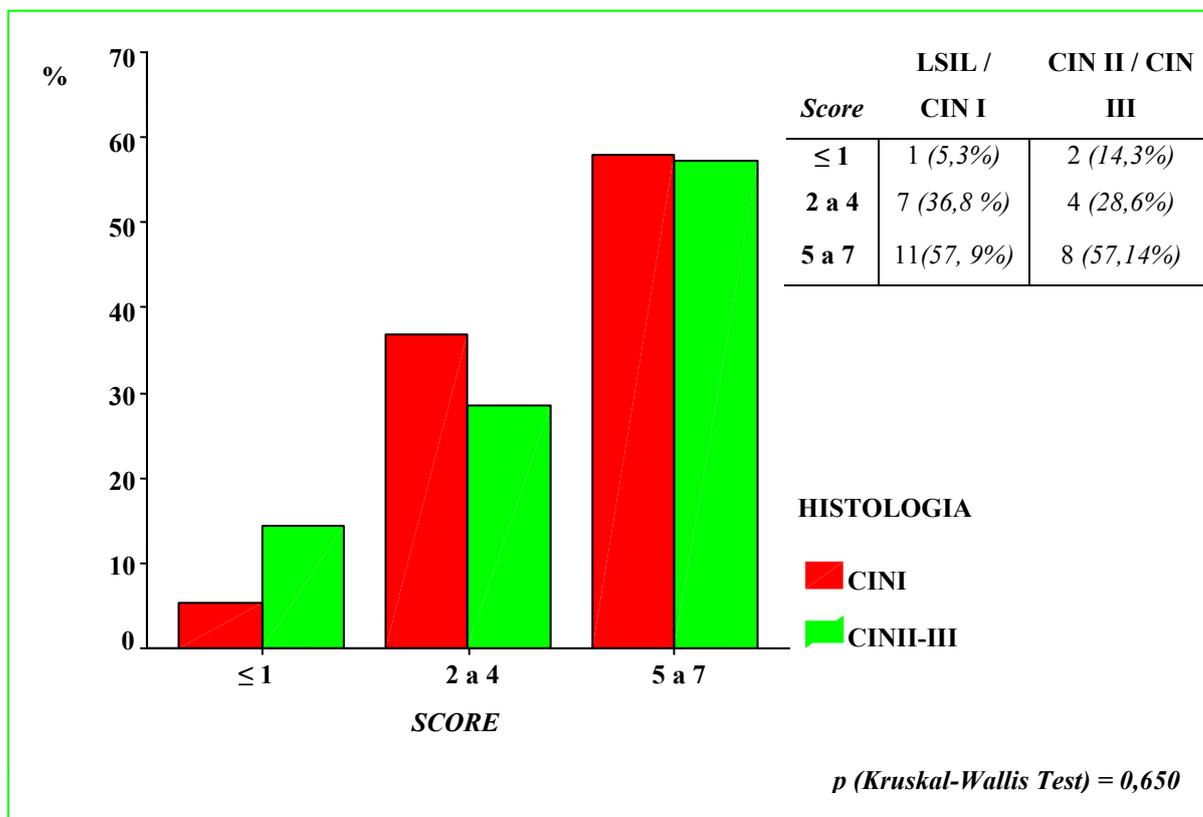
A média do *score* utilizado para avaliação da expressão da maspina, não apresentou diferenças significativas nas lesões de LSIL / CIN I com HPV e CIN II /CIN III (tabela IV).

Tabela IV. Média do *score* de imunomarcção da maspina nos dois grupos histológicos (**p* (Mann-WhitneyTest) = 0,872).

Diagnóstico Histológico (<i>n</i> = 33)	Expressão da maspina	
	Score (1 a 7) (média)*	
LSIL / CIN I (<i>n</i> = 19)	4,47	
CIN II / CIN III (<i>n</i> = 14)	4,43	

Agrupando o *score* imunohistoquímico em três grupos (≤ 1 , 2 a 4 e 5 a 7) verificou-se a seguinte distribuição de lesões cervicais (Fig.7):

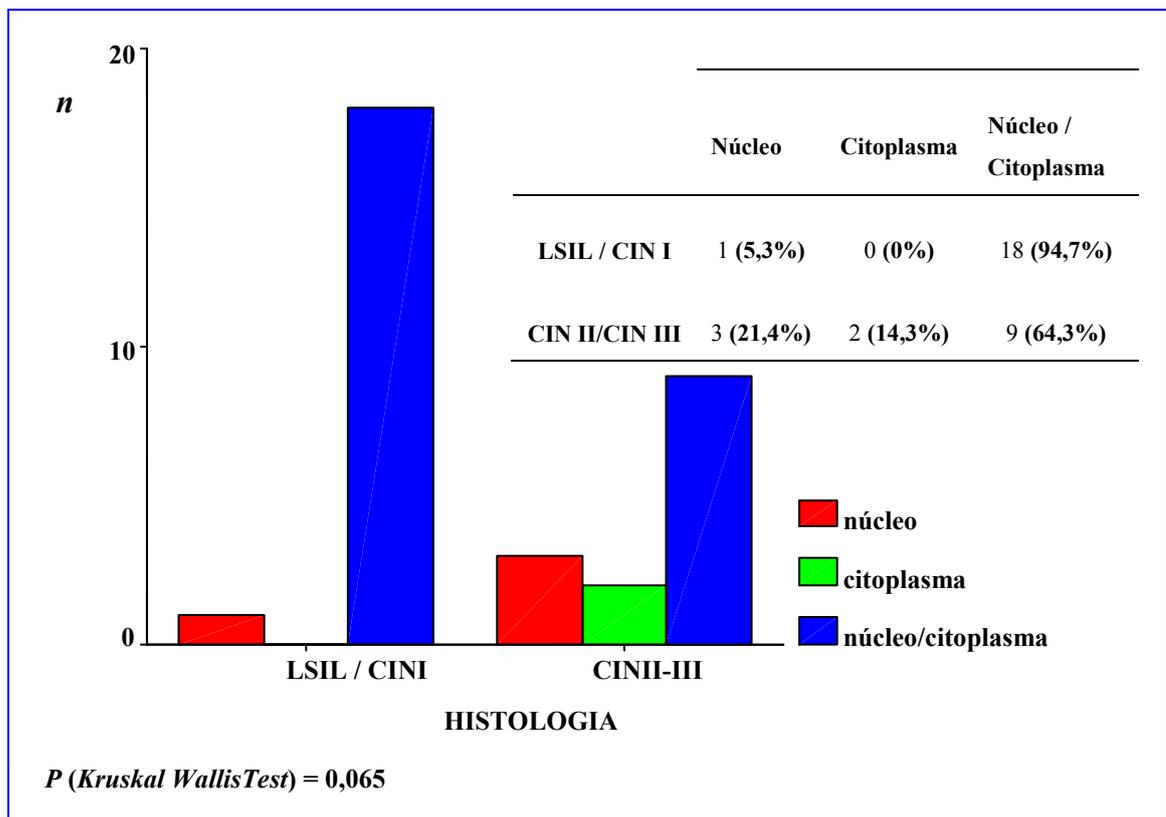
Fig.7. Distribuição da imunomarcção da maspina nas lesões de baixo e alto grau de acordo com o *score*.



Embora se verifique a tendência para uma maior expressão da maspina nas lesões cervicais de baixo grau, esta diferença não é estatisticamente significativa ($p = 0,650$).

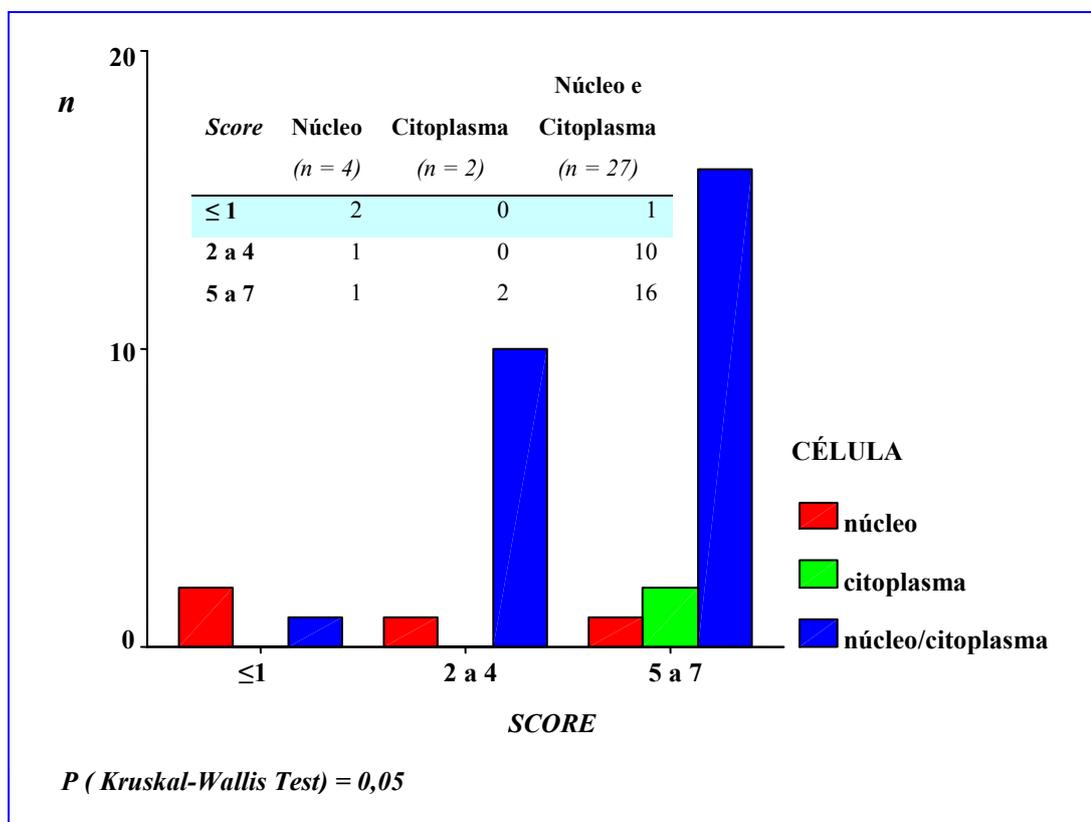
Foi igualmente estudada a distribuição celular e epitelial da expressão da maspina nas lesões de baixo e alto grau, verificando-se diferenças muito próximas da significância estatística. As lesões CIN II/ CIN III mostraram grande expressão da maspina a nível nuclear enquanto que, nas lesões LSIL / CIN I associadas ao HPV, verificou-se ser mais frequente a imunomarcção simultânea nuclear e citoplasmática (Fig.8).

Fig.8. Expressão celular da maspina.



Quando se consideram os grupos do *score* da imunomarcção, verifica-se ser mais localizada ao núcleo a expressão da maspina nos scores mais baixos enquanto que 96,3% das doentes com marcação simultânea nuclear e citoplasmática têm scores superiores a 2 ($p = 0,05$ – *Kruskal-Wallis Test*) (Fig.9).

Fig.9. Expressão celular da maspina de acordo com os grupos do *score* imunohistoquímico.



Verificam-se também diferenças na distribuição epitelial da maspina nas camadas basal, intermédia e superficial entre as lesões cervicais de baixo e alto grau embora sem significância do ponto de vista estatístico (Tabela V).

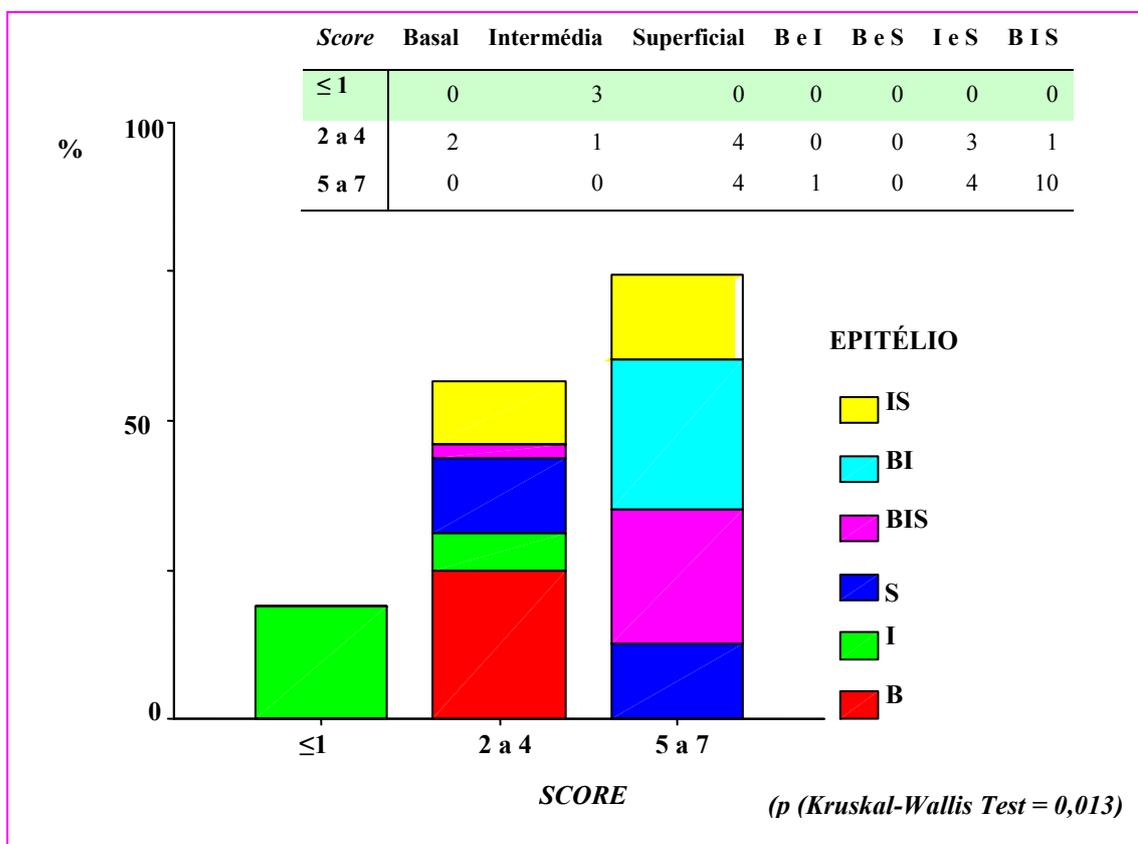
Tabela V. Distribuição epitelial da expressão da maspina nas lesões cervicais.

(**B e I** = basal e intermédia; **B e S** = basal e superficial; **I e S** = intermédia e superficial; **BIS** = basal, intermédia e superficial).

Diagnóstico Histológico	Expressão da Maspina						
	Basal	Intermédia	Superficial	B e I	BeS	I e S	BIS
LSIL / CIN I	1 (5,3%)	2 (10,5%)	4 (21,0%)	1 (5,3%)	0	6 (31,6%)	5 (26,3%)
CIN II / CIN III	1 (7,1%)	2 (14,3%)	4 (28,6%)	0	0	1 (7,1%)	6 (42,9%)

Considerando o *score* de imunomarcção verifica-se que a maspina é expressa em todas as camadas do epitélio em 36,7% das lesões com $score \geq 2$, em 26,7% na camada superficial e em 23,3% nas camadas intermédia e superficial. A totalidade das lesões que apresentam $score \leq 1$ expressam a maspina na camada intermédia do epitélio ($p = 0,013$) e não se verifica imunomarcção na camada basal nem na superficial nas lesões com este *score* (Fig. 10).

Fig. 10. Distribuição epitelial da maspina de acordo com o *score* de imunomarcação.

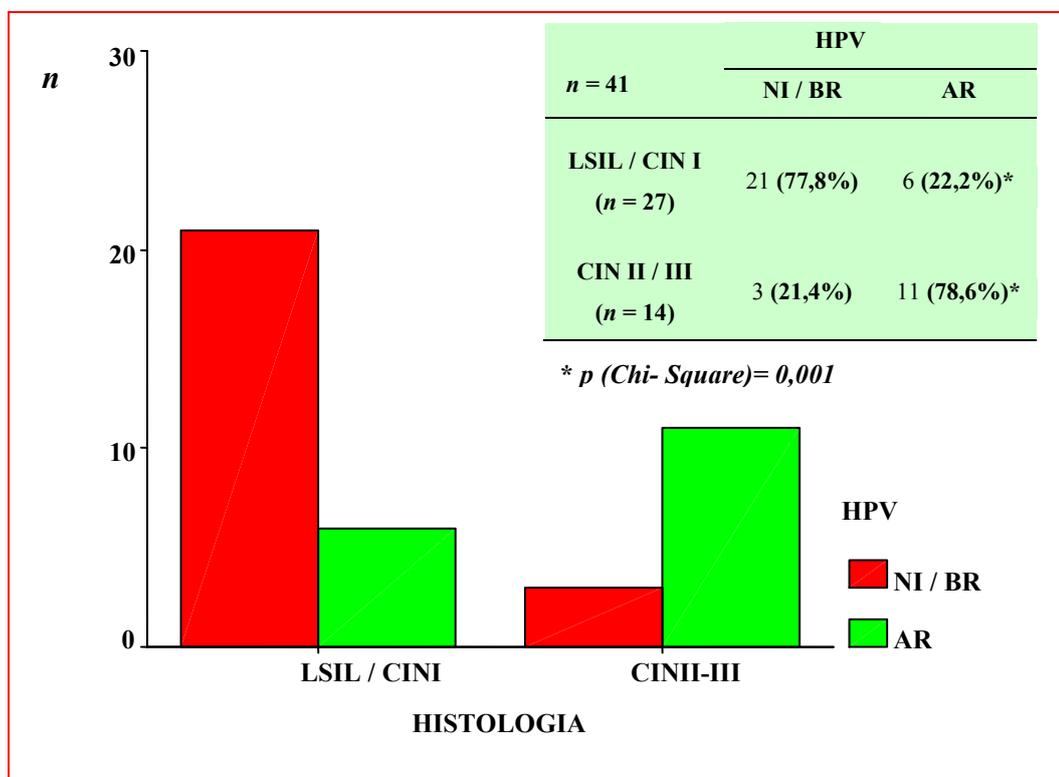


3.2. Genotipagem do HPV

No sentido de correlacionar os dados da expressão e distribuição da maspina nas lesões cervicais com os vários tipos de HPV foi efectuada uma genotipagem dos HPV nas amostras de doentes com lesões cervicais de alto e baixo grau.

Verificou-se serem mais frequente os HPV de alto risco nas doentes com lesões cervicais CIN II/III relativamente às doentes com lesões de baixo grau, diferença esta estatisticamente significativa ($p = 0.001$) - (Fig.11).

Fig.11. Distribuição dos tipos de HPV nas lesões cervicais (NI – Não Identificado; BR – Baixo Risco; AR – Alto Risco).



O HPV 16 foi o HPV de alto risco mais frequente, constituindo cerca de 64% dos encontrados nas lesões CIN II /CIN III (Tabela VI).

Tabela VI. HPV de alto risco mais frequentes nas LSIL e HSIL.

HPV de alto risco	LSIL/CIN I (n = 6)	CIN II / CIN III (n = 11)
16		7 (63,6%)
16 e 33		1 (9%)
16 e 52	1	
18	1	1 (9%)
31		1 (9 %)
31 e 11		1 (9%)
39	1	
58	1	
59	1	
Não classificável	1	

A correlação dos resultados de genotipagem do HPV com a expressão da maspina mostram que as cinco doentes com lesões LSIL / CIN I onde se identificaram HPV de alto risco apresentaram baixa expressão da maspina.

As três doentes com lesões CIN II / CIN III e HPV de baixo risco ou HPV não identificados apresentaram *scores* na imunomarcação para a maspina mais altos, dois casos com *score* 6 e, um, com *score* 3. Nos dois primeiros casos a expressão da maspina foi expressa no citoplasma celular e em todas as camadas do epitélio. No último caso, houve imunomarcação simultânea citoplasmática e nuclear e na camada superficial do epitélio.

Verifica-se, assim, que a expressão da maspina é tendencialmente menor nas lesões onde o HPV encontrado é de alto risco, embora esta diferença não seja significativa do ponto de vista estatístico ($p = 0,114$ – *Kruskal-Wallis Test*) – Fig.12.

Fig. 12. Relação entre tipos de HPV e a imunomarcação da maspina.

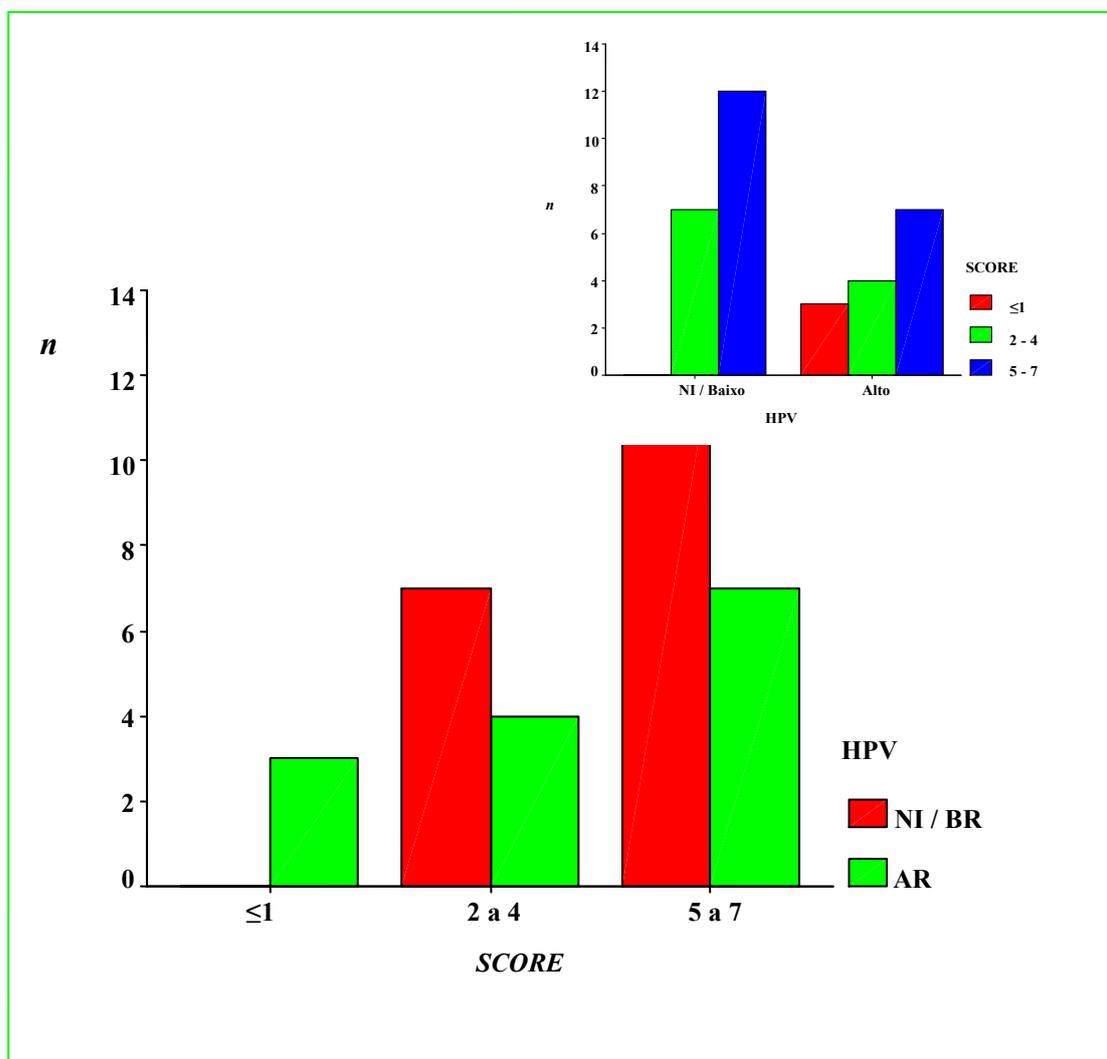


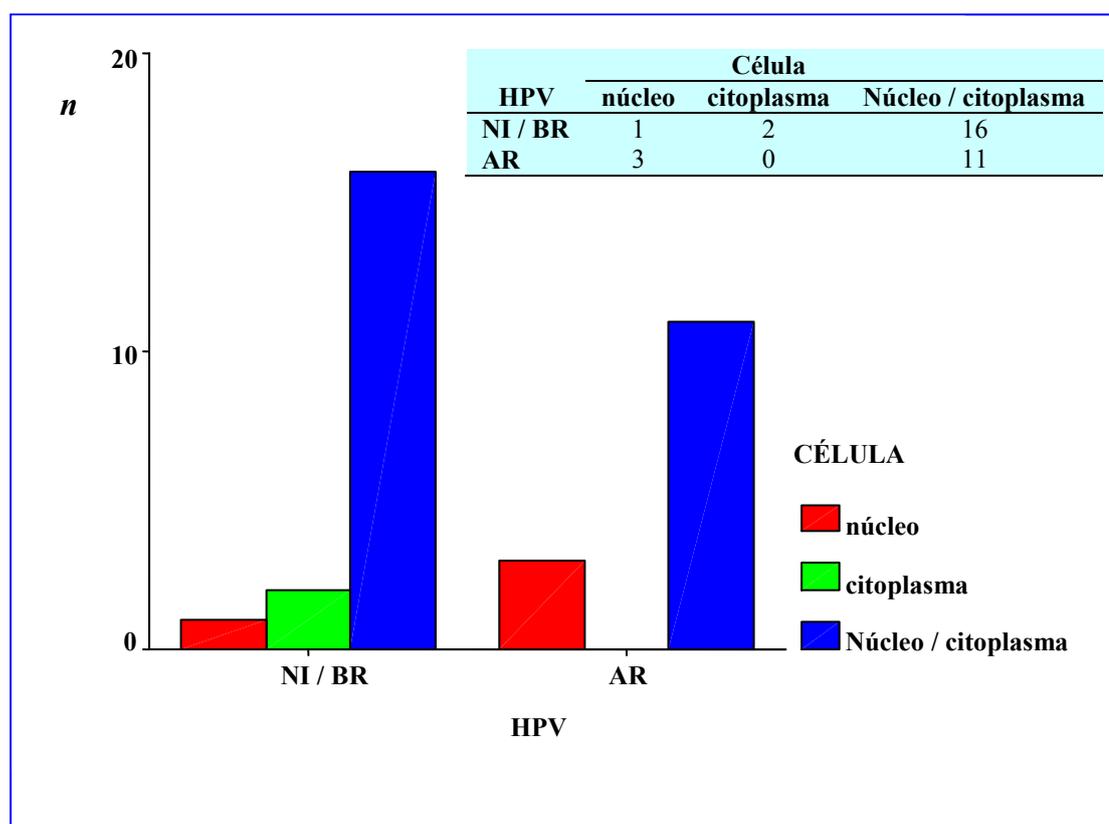
Tabela VII. * metade das doentes com HPV de alto risco apresentam $score \leq 4$.

Expressão da maspina <i>Score</i> (n = 33)	HPV NI / Baixo risco (19/33)	HPV de Alto risco (14/33)
≤1	0 (0%)	3 (21,4%) *
2 a 4	7 (36,8%)	4 (28,6%) *
5 a 7	12 (63,2%)	7 (50%)

Três doentes com *score* mínimo de 1 no estudo imunohistoquímico apresentavam, num caso, lesão cervical de baixo grau e, em dois, lesão de alto grau, todas com HPV de alto risco, HPV 59, HPV 16 e HPV 31, 11, respectivamente.

Quando se consideram os tipos de HPV verifica-se que as amostras com genotipagem positiva para HPV de alto risco, apresentam uma distribuição da maspina a nível nuclear maior que nas amostras em que não se detectaram HPV ou estes eram de baixo risco ($p = 0.569$) – Fig. 13.

Fig. 13. Distribuição celular da maspina de acordo com as estirpes de HPV.

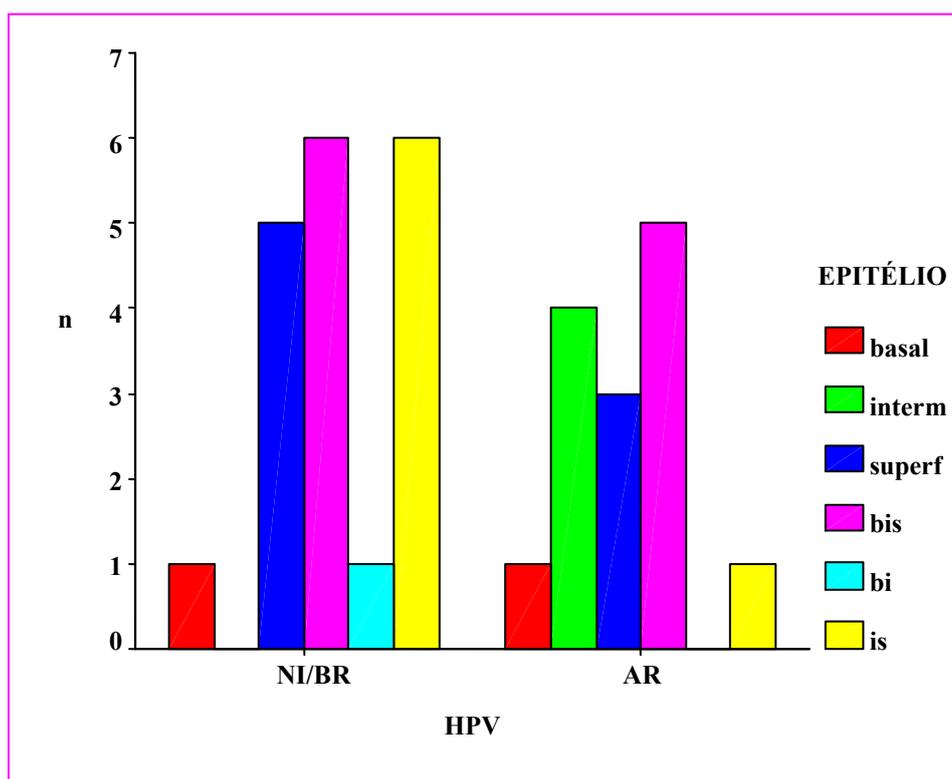


A imunomarcção da maspina no epitélio apresentou diferenças entre as amostras com HPV de alto risco e as associadas ao HPV de baixo risco ou não identificado ($p = 0,032$ – *Kruskal-Wallis Test*). Ocorreu apenas expressão da maspina na camada intermédia nas biópsias que apresentavam HPV de alto risco. Por outro lado, quando o HPV era de baixo risco ou não se identificou, a maspina foi evidente nas camadas intermédia e superficial do epitélio, em 31,6% dos casos e nas amostras com HPV de alto risco em, apenas 7,1%. (Tabela VIII e Fig. 14).

Tabela VIII. Distribuição da maspina no epitélio nas biópsias com HPV de AR e nas biópsias com HPV de BR ou NI.

HPV	Basal	Intermédia	Superficial	B e I	BeS	I e S	B I S	33
NI/BR	1 (5,3%)	0 (0%)	5 (26,3%)	1 (5,3%)	0 (0%)	6 (31,6%)	6 (31,6%)	19
AR	1 (7,1%)	4 (28,6%)	3 (21,5%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (7,1%)	5 (35,7%)	14

Fig. 14. Distribuição epitelial da maspina de acordo com estirpes de HPV.



No conjunto os resultados obtidos evidenciam uma tendência para associar a presença de HPV de alto risco nas lesões mais graves com uma diminuição da expressão da maspina.

3.3. Análise de polimorfismos genéticos na maspina

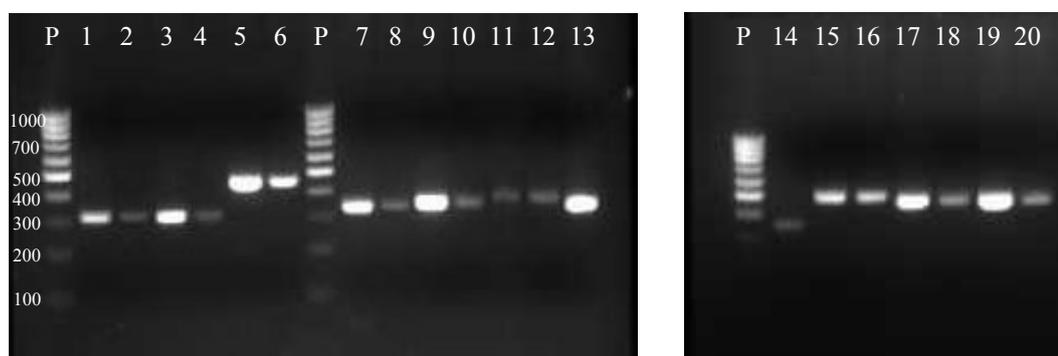
Os resultados obtidos anteriormente sugerem que eventuais factores que levem à diminuição dos níveis de maspina podem contribuir para um risco acrescido de desenvolver lesões de alto grau. Neste contexto, a presença de mutações no gene da maspina podem influenciar não só a expressão ao nível transcripcional e traducional como também a distribuição e actividade da própria proteína. Com o objectivo de avaliar se eventuais polimorfismos genéticos podiam justificar alguns dos desvios observados, procedeu-se á sequenciação do gene da maspina na população com lesões cervicais (19 doentes) e nos respectivos controlos saudáveis (35 mulheres).

A abordagem experimental consistiu na amplificação por PCR das regiões reguladoras e codificantes da maspina seguida de sequenciação directa pelo método de Sanger.

3.3.1. Amplificação das zonas codificantes e reguladoras da maspina.

As condições de amplificação do DNA para cada região a amplificar foram determinadas por reacções de PCR utilizando duas temperaturas diferentes de *annealing* para cada par de *primers*. Após a reacção, a existência de produtos de PCR e a verificação dos tamanhos correspondentes foram realizadas por observação em gel de agarose a 1,5% com brometo de etídeo.

GEL A



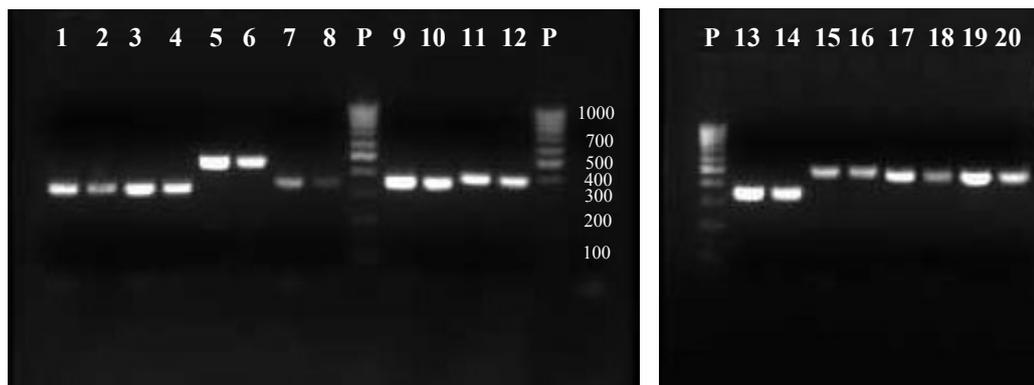
GEL B

Figura 15. Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos em diferentes condições. Gel A: Amostras 10 (n^os ímpares) e VIII (n^os pares) amplificadas para todos os segmentos. Gel B: Amostras 7 (n^os ímpares) e III (n^os pares) amplificadas para todos os segmentos. Temperaturas de annealing usadas em cada reacção: **Gel A.** Segmento P3 - 5,6 – 51°C; segmento P1 -1,2 e P8 - 15 e 16 – 53°C; segmento P6- 11, 12, segmento P7- 13, 14, segmento P9 - 17, 18 e segmento P10 – 19, 20 - 55°C; segmento P2 - 3,4, segmento P4 - 7,8, segmento P5 – 9,10 – 58°C. **Gel B.** Segmento P3- 5,6 – 54°C; segmento P1-1,2, segmento P8 – 15,16 – 56°C, segmento P6 - 11, 12, segmento P7 - 13, 14, segmento P9 - 17, 18 e segmento P10 – 19,20 - 58°C; segmento P2 - 3,4, segmento P4 - 7,8 e segmento P5 – 9,10 – 60°C.

Os resultados obtidos permitiram estabelecer as temperaturas de *annealing* para as reacções de PCR de cada segmento, descritas na secção de Materiais e Métodos.

3.3.2. Sequenciação e análise dos polimorfismos genéticos

Após amplificação e purificação cada fragmento do gene da maspina foi sequenciado nos dois sentidos num sequenciador automático e a análise das sequências em cada zona exónica ou de regulação foi efectuada por comparação com a sequência publicada.

As sequências obtidas foram alinhadas com a sequência descrita para o gene da maspina anteriormente referido, segmento a segmento, utilizando o programa Vector NTI 10.1.1. (Nov.04, 2005)[®] 2005 Invitrogen Corporation, sendo verificada a presença de alterações relativamente à sequência publicada. As alterações encontradas foram posteriormente comparadas com SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) descritos para o gene da maspina na base de dados dbSNP do NCBI, (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/).

3.3.3. Análise por região do gene da maspina

Exão 1

O exão 1 do gene da maspina corresponde à zona reguladora 5'. Neste exão foi detectada uma alteração em duas amostras, uma normal e outra em doente com LSIL. A alteração não se encontra descrita como SNP na base de dados. A sequência de referência apresenta o nucleótido G enquanto que as amostras são heterozigóticas apresentando os dois alelos: G e T.

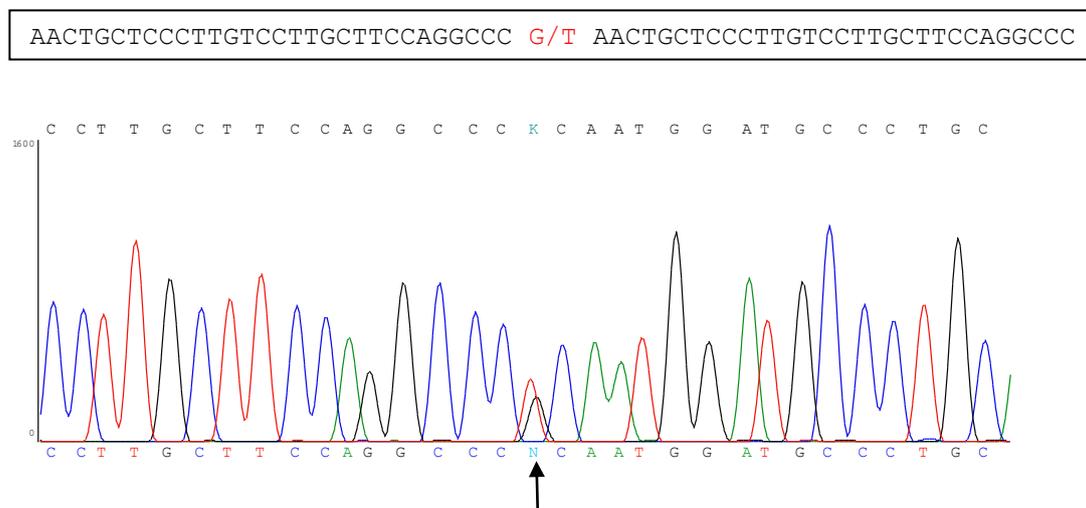


Figura 16. Cromatograma da reacção de sequenciação correspondente à alteração observada na sequência do segmento 1 da maspina. A seta indica a posição do local de heterozigotia. K representa as bases G e T.

Exão 2

No exão 2 foi detectada uma alteração, correspondente à heterozigotia TC, localizada no início do intrão 2, em seis amostras de doentes saudáveis e nas amostras de duas doentes com LSIL. Esta alteração corresponde ao SNP rs2271253, já descrito para este gene. O alelo ancestral deste SNP é a timina (T).

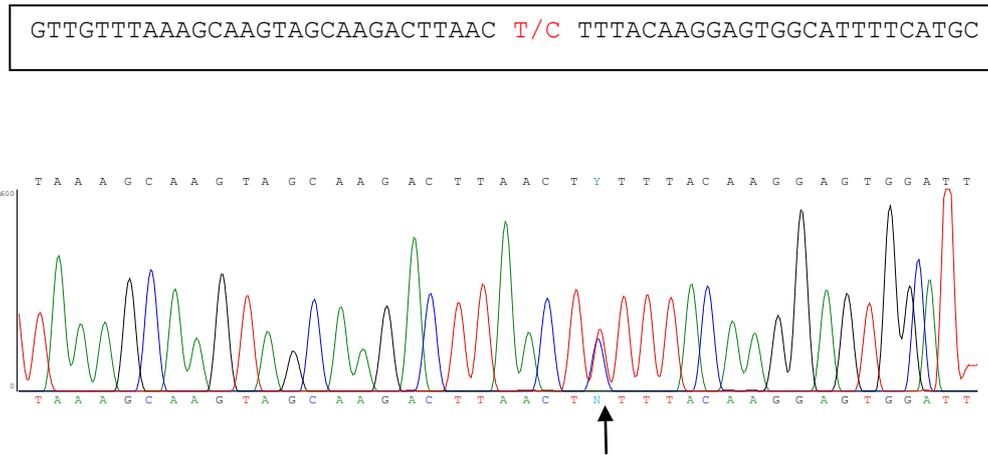
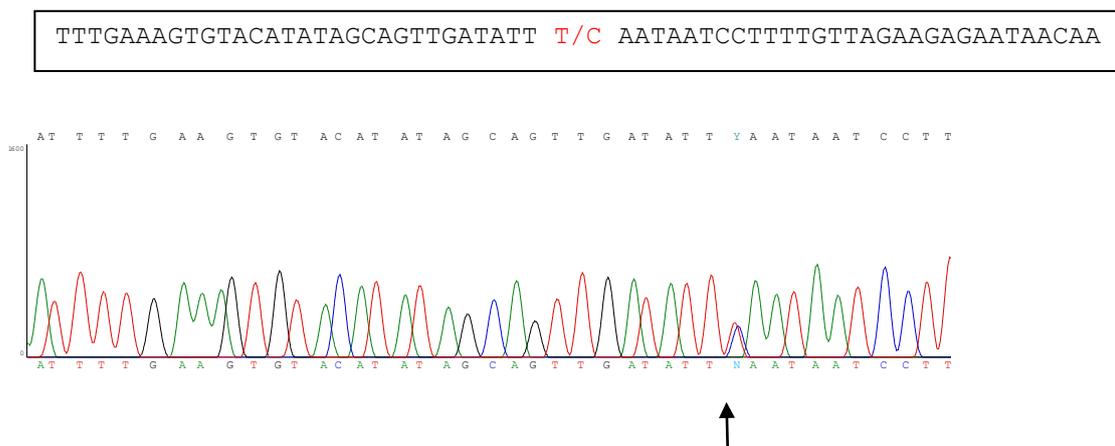


Figura 17. Cromatograma da reacção de sequenciação correspondente à alteração observada na sequência do intrão 2 da maspina. A seta indica a posição do local de heterozigotia. Y representa C e T.

Exão 3

No segmento 3, o qual amplifica a sequência correspondente ao exão 3, foram detectadas duas alterações em relação à sequência publicada. A primeira localiza-se no final do intrão 2 e corresponde a um SNP já conhecido – rs 17071181. Este SNP foi detectado na forma de heterozigotia TC em nove indivíduos sem patologia cervical e nas amostras de 2 doentes com LSIL. O alelo ancestral corresponde à timina (T).

A



B

CAGGAGTTCATCAGCTCTACGAAGAGACC C/G TATGCAAAGGAATTGGAAACTGTTGACTTC

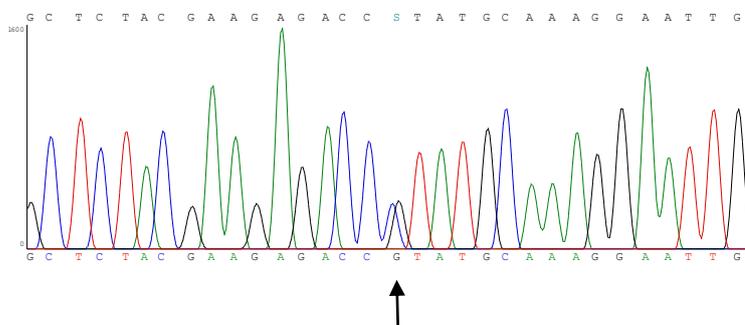


Figura 18. Cromatograma das reacções de sequenciação correspondentes às alterações observadas no segmento 3 da maspina. As setas indicam a posição do local de heterozigotia. **A.** SNP rs 17071181. Y representa C e T. **B.** SNP rs12454742. S representa G e C.

A segunda alteração detectada, já no interior do exão, corresponde ao SNP rs12454742. O alelo ancestral corresponde à presença de uma citosina. Nas amostras de indivíduos saudáveis seis amostras são homozigóticas para o alelo G e 10 amostras são heterozigóticas CG. Quatro doentes com patologia cervical apresentavam (CIN II, LSIL, CIN II e LSIL) também homozigotia para o alelo G e oito (sete com LSIL / CIN I e uma com CIN III) apresentam heterozigotia na mesma posição. Dado que o SNP rs12454742 se encontra numa zona codificante foi verificada a possibilidade de alteração do aminoácido na proteína tendo-se verificado que qualquer uma das versões encontradas codifica o mesmo aminoácido, a prolina.

Exão 4

No segmento 4 amplificado por PCR foram encontradas duas alterações dentro da zona do exão 4. Ambas correspondem a SNP descritos. O primeiro, SNP rs 2289519, tem por alelo ancestral uma citosina. Foi detectado na forma de homozigótico para a timina (T) em 16 amostras mulheres sem patologia cervical. No caso das amostras das doentes com patologia o homozigótico T foi detectado em nove amostras, sete com LSIL / CIN I e duas com CIN II / CIN III. Em duas amostras de doentes sem patologia e, numa com lesão de baixo grau foi detectada a presença do heterozigótico CT. Este SNP

afecta o aminoácido encontrado na proteína. Na presença de citosina é codificada uma prolina. No caso da timina é introduzida uma valina no mesmo local da proteína.

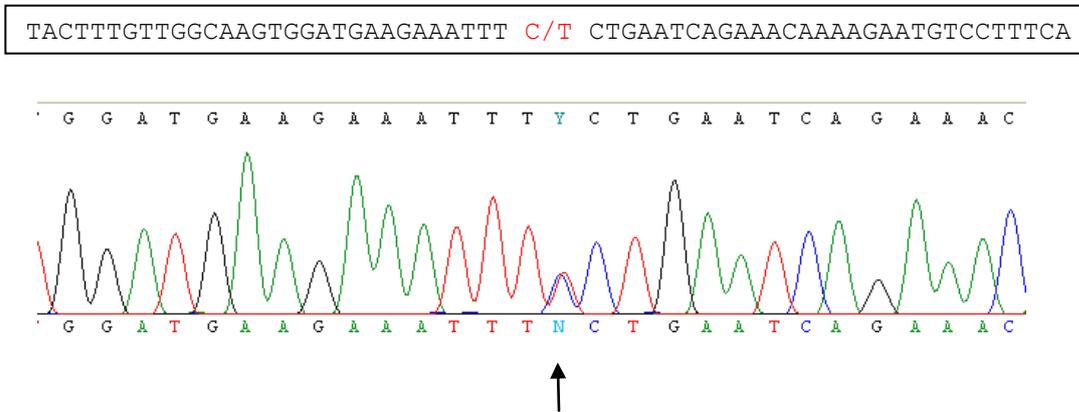


Figura 19. Cromatograma da reacção de sequenciação correspondente à alteração observada no segmento 4 da maspina. A seta indica a posição do local de heterozigotia. Y representa C e T.

O segundo SNP, rs2289520, foi detectado na forma de heterozigotia em 3 amostras de mulheres sem patologia cervical e numa com LSIL e na forma de homozigotia para a guanina em 16 amostras de mulheres sem lesão cervical e em nove doentes com patologia, dos quais cinco apresentavam LSIL / CIN I e quatro CIN II/ III. Mais uma vez este SNP altera a sequência de aminoácidos na proteína. Na presença de citosina é codificada uma leucina, na presença de guanina é introduzida uma valina.

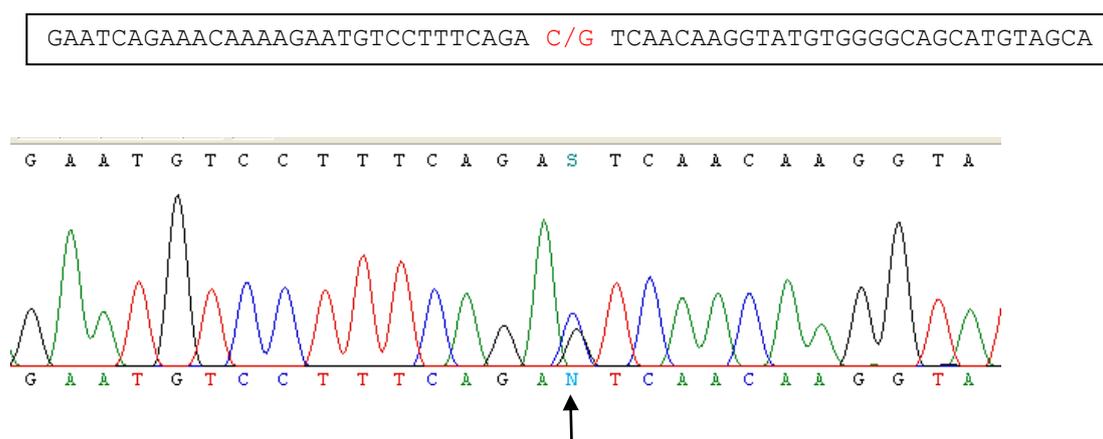


Figura 20. Cromatograma da reacção de sequenciação correspondente à alteração observada no segmento 4 da maspina. A seta indica a posição do local de heterozigotia.

Exão 5

No segmento P5 correspondente ao exão 5 do gene da maspina não foram encontradas quaisquer alterações na sequência de nucleótidos. Quer nos indivíduos doentes quer nos controlos a sequência determinada era idêntica à sequência de referência publicada no NCBI .

Exão 6

O exão 6 foi dividido em dois segmentos, sobreponíveis, tendo sido encontradas duas alterações em cada um deles. A segunda alteração do primeiro segmento e a primeira alteração do segundo segmento correspondem à mesma variação.

A primeira alteração, CTTCAGT/C, não está descrita como SNP. A sequência publicada apresenta nesta posição a base T. Nas nossas amostras de mulheres sem patologia cervical foram detectados 14 homozigóticos C, 13 heterozigóticos TC. Apenas uma amostra homozigótica T. Nas amostras das doentes, oito são homozigóticos C, seis são heterozigóticos TC e os restantes homozigóticos T. A existência desta alteração não compromete a sequência de proteína uma vez que em ambos os casos, T ou C, o aminoácido na proteína corresponde a uma serina.

A segunda alteração encontrada, AATGTTA/G, também não se encontra descrita como SNP. O alelo da sequência de referência, A, foi encontrado na forma de homozigotia em 10 amostras de mulheres sem patologia. A versão de homozigóticos G foi detectada em seis amostras. As restantes correspondem a heterozigóticos AG. No caso das amostras provenientes de doentes com patologia, quatro amostras apresentavam o homozigótico A, todas correspondendo a doentes com LSIL / CIN I, sete amostras, três com CIN II / CIN III e quatro com LSIL / CIN I o heterozigótico AG e as restantes o homozigótico G. Esta alteração interfere com o aminoácido desta posição na proteína. No caso da presença de G a triplete codifica a valina, no caso de A o triplete codifica uma isoleucina.

A terceira alteração corresponde ao SNP rs8093128. Para este SNP todas as nossas amostras são homozigóticas para a base C. A sequência publicada apresenta a timina nesta posição. A localização desta alteração não interfere com o aminoácido codificado pelo triplete, sendo em todos os casos codificada uma isoleucina.

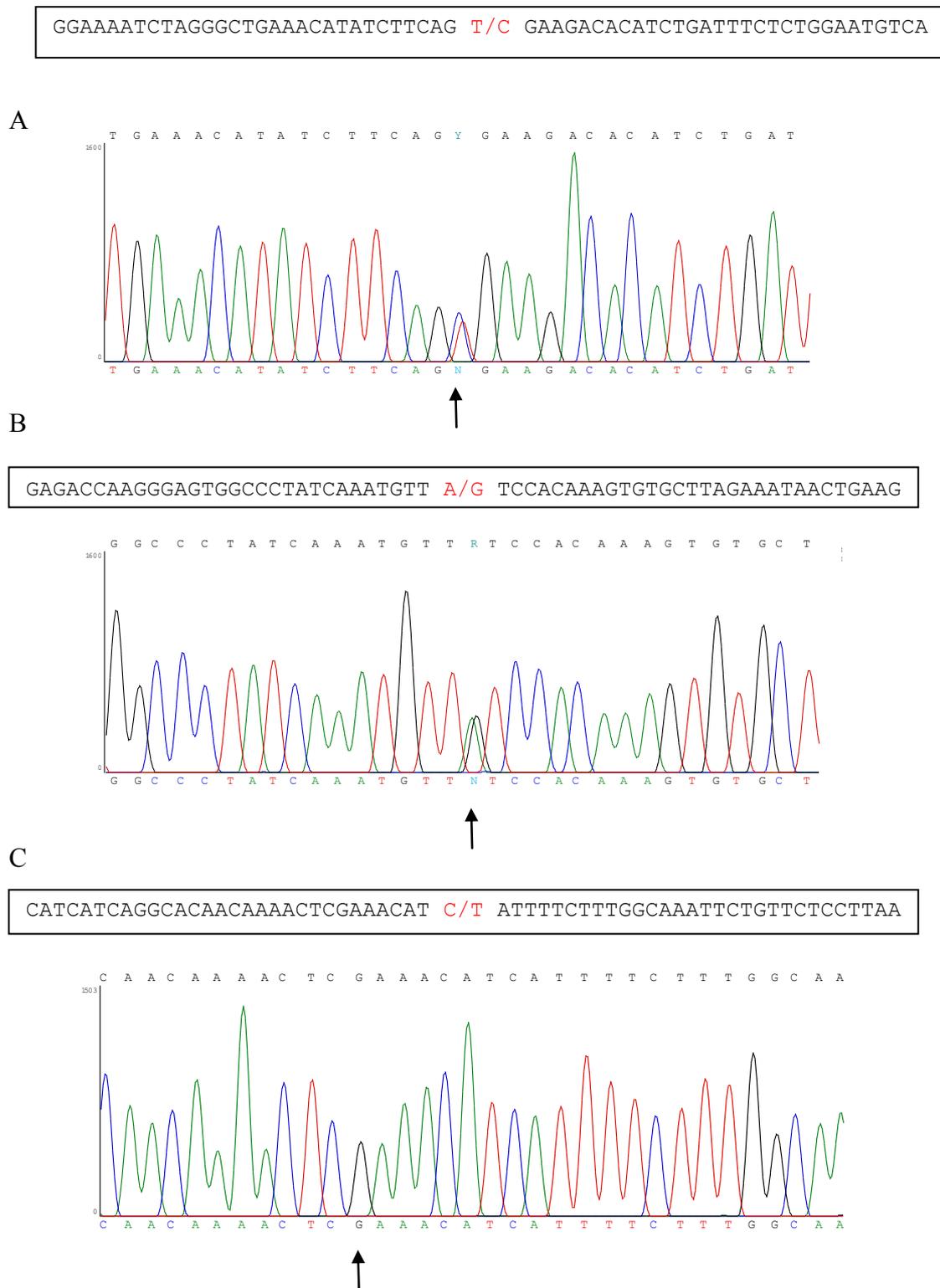


Figura 21. Cromatogramas das reações de sequenciação correspondentes às alterações observadas no exão 6 da maspina. As setas indicam a posição do local de heterozigotia. **A.** Alteração não descrita como SNP. **B.** Alteração não descrita como SNP. **C.** SNP rs8093128.

3'UTR

A região 3' UTR foi dividida em três segmentos sobreponíveis. Em todos eles foram encontradas alterações somando um total de cinco, duas das quais sem equivalência na base de dados de SNP. A primeira alteração, detectada no segmento A (Figura 25) corresponde ao SNP rs12150761 (alelo ancestral T), encontrado na forma de heterozigotia TC em três amostras de mulheres do grupo controlo e em duas doentes, uma com LSIL e, outra, com CIN II e na forma de homozigotia C numa mulher sem patologia cervical.

No segmento B foram encontradas duas alterações, a primeira corresponde ao SNP rs894 e a segunda GTCAAAA/T que não se encontra descrita como SNP. Para ambas as alterações o alelo da sequência de referência é a adenina (A).

No primeiro caso 11 amostras do grupo controlo distribuem-se pelos homozigóticos C e seis pelos homozigóticos A. Os restantes são heterozigóticos AC. Nas doentes, três amostras apresentam homozigotia para A, sete amostras homozigotia para C e as restantes heterozigotia AC.

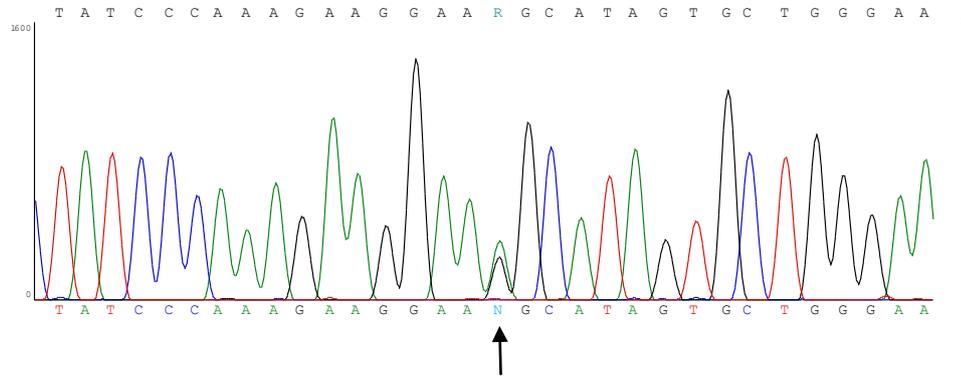
No segundo caso, duas amostras do grupo de controlo distribuem-se pelos homozigóticos A, 15 pelos homozigóticos T. Os restantes são heterozigóticos AT. Nas doentes duas amostras são homozigóticas A, nove amostras são heterozigóticas AT e as restantes são homozigóticas T.

No segmento C as alterações encontradas estão descritas como SNPs, rs17071220 e rs11664401. O SNP rs17071220 foi detectado na forma de homozigótico C, correspondente ao alelo ancestral, em 15 amostras, na forma homozigótica T em duas amostras e na forma heterozigótica CT nas restantes amostras do grupo controlo. Nas amostras de doentes, duas são homozigóticas para T, nove heterozigóticas CT e as restantes homozigóticas C.

O SNP rs11664401 foi detectado na forma homozigótica A para 15 amostras do grupo controlo na forma homozigótica G, alelo ancestral, para duas amostras e heterozigótica GA nas restantes amostras. No grupo das doentes duas amostras são homozigóticas para G. Oito amostras são homozigóticas para o alelo A e as restantes heterozigóticas.

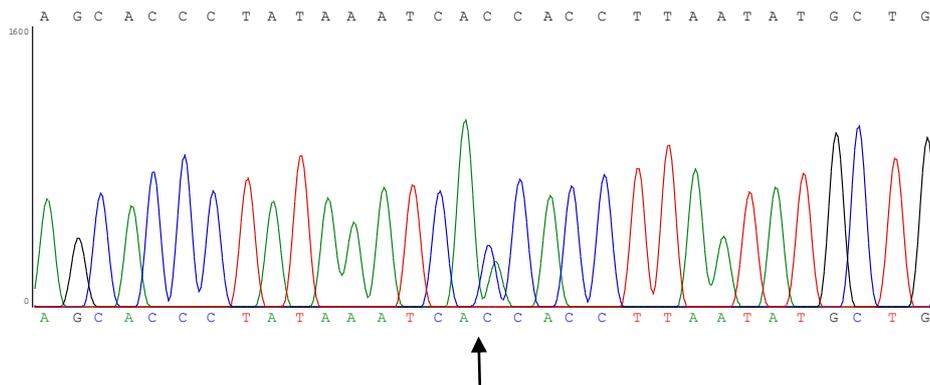
ATTTGGAAGCTCTTCTTCCCAGCACTATGC C/T TTCCTTCTTTGGGATAGAGAATGTTCCAGA

A



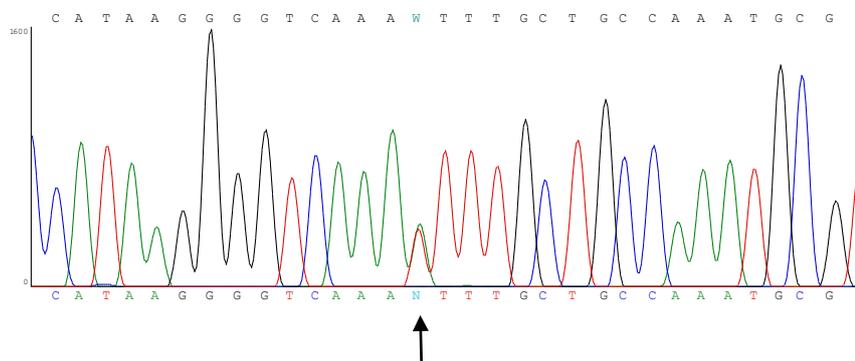
B

Cagatctggggcagcaacctataaatca A/C caccttaatatgctgcaacaaaatgtagaa



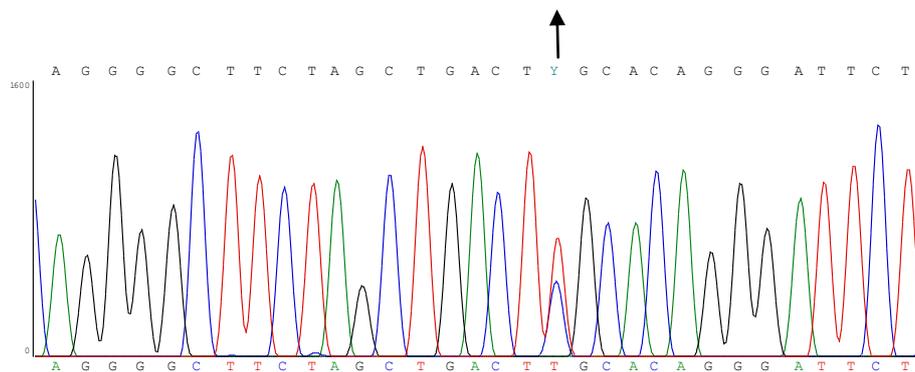
C

TAAAGACTAAGTAGCCATAAGGGGTCAA A/T TTTGCTGCCAAATGCGTATGCCACCAACTT



D

AATTTGTAAAGTTGGTTGGATAAGCTATCC G/A TGTTGCAGGTTTCATGGATTA TTCTCTATA



E

TAGACTGGTGGCAGGGGCTTCTAGCTGACT C/T GCACAGGGATTCTCACAATAGCCGATATCA

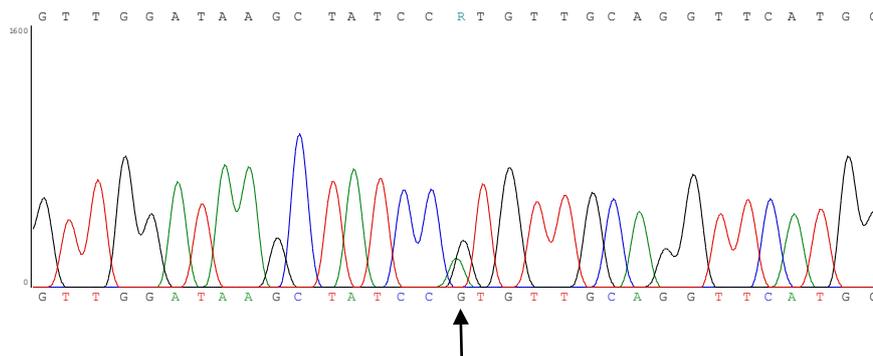


Figura 22. Cromatogramas das reacções de sequenciação correspondentes às alterações observadas no 3'UTR do gene da maspina. As setas indicam a posição do local de heterozigotia. **A.** Alteração não descrita como SNP rs12150761. **B.** Alteração não descrita como SNP. **C.** Alteração não descrita como SNP **D.** Alteração descrita como SNP rs17071220. **E.** Alteração descrita como SNP 11664401.

3.3.4 Caracterização do genótipo por doente

Tabela IX- Genotipagem da maspina por doente

Doente	rs2271253		rs17071181		rs12454742		rs2289519		rs2289520		ND	ND	rs8093128		rs12150761		rs894	
	P1	P2	P3	P3	P4	P4	P5	P6	P6/P7	P7			P8	P8	P9			
	5'UTR	Intrão2	Intrão2	Exão3	Exão4	Exão4	Exão5	Exão6	Exão6	Exão6			Exão6	3'UTR	3'UTR			
I				CG	T			C	G	C			C				C	
II								C	G	C			C				C	
III				G					G	C			C	TC			AC	
IV								C	G	C			C				C	
V								C	G	C			C				C	
VI				G	T					C			C					
VII				G	T			TC	AG	C			C				AC	
VIII				CG	T				AG	C			C				AC	
IX	GT	TC	TC	CG	CT	CG				C			C	TC				
X				G	T	G				C			C					
XI				CG	T	G		TC	AG	C			C				AC	
XII						G		C	G	C			C				C	
XIII				CG	T	G		TC	AG	C			C				AC	
XIV						G		C	G	C			C				C	
XIX		TC	TC					TC	A	C			C				AC	
XV				CG		G		C	G	C			C				C	
XVI				CG	T	G		TC	AG	C			C				AC	
XVII						G		C	AG	C			C				AC	
XVIII				CG	T	G		TC	AG	C			C				AC	

3.3.5. Correlação genótipo-fenótipo

No sentido de tentar correlacionar as alterações detectadas no gene da maspina com a expressão e distribuição celular e ainda com a estirpe de HPV presente nos doentes foi efectuada uma análise comparativa dos resultados que são apresentados na Tabela X.

Duas doentes com lesões intra-epiteliais de baixo grau, com HPV de alto risco e com baixa expressão da maspina na camada intermédia do epitélio, apresentaram alterações ao longo de todo o gene sendo, particularmente relevantes do ponto de vista biológico, as alterações na região 3'UTR, região descrita como importante na regulação pós-transcrição da expressão génica.

Tabela X. Correlação genótipo – fenótipo nas doentes com LSIL e HSIL

Doente	Histol	Score	Celula	Epitélio	HPV	ND	rs2271253	rs17071181	rs12454742	rs2289519	rs2289520	ND	ND	rs12150761	rs894
						GT	TC	TC	CG	CT	CG	TC	AG	TC	AC
						P1	P2	P3	P3	P4	P4	P6	P6/P7	P8	P9
5'UTR	Intrão2	Intrão2	Exão3	Exão4	Exão4	Exão6	Exão6	3'UTR	3'UTR						
XIV	HSIL	1	N	I	AR					G	C	G			C
XVI	HSIL	2	NC	S	AR			CG	T	G	TC	AG			AC
III	HSIL	4	NC	IS	AR			G				G	TC		AC
IV	HSIL	5	NC	BIS	AR						C	G			C
XVII	HSIL	5	N	IS	AR					G	C	AG			AC
II	HSIL	6	C	BIS	NI						C	G			C
VII	HSIL	6	NC	S	AR			G	T		TC	AG			AC
XII	HSIL	6	C	S	NI					G	C	G			C
XIII	LSIL	1	NC	I	AR			CG	T	G	TC	AG			AC
XI	LSIL	2	NC	I	AR			CG	T	G	TC	AG			AC
XV	LSIL	4	N	IS	NI			CG		G	C	G			C
I	LSIL	6	NC	IS	NI			CG	T		C	G			C
IX	LSIL	6	NC	IS	NI	GT	TC	TC	CG	CT	CG			TC	
VI	LSIL	7	NC	IS	NI			G	T						
V	LSIL				NI						C	G			C
VIII	LSIL				NI			CG	T			AG			AC
X	LSIL				NI			G	T	G					
XVIII	LSIL				NI			CG	T	G	TC	AG			AC
XIX	LSIL						TC	TC			TC	A			AC

4. Discussão

O cancro do colo uterino embora com taxas de mortalidade que têm vindo a diminuir após a introdução da citologia cervical como método de rastreio, permanece como a segunda neoplasia mais frequente na mulher em todo o mundo.

Qualquer factor que permita prever a regressão ou a progressão das lesões cervicais pré-neoplásicas, terá uma relevante importância clínica. Vários factores têm sido estudados, entre os quais, a genotipagem do HPV, para avaliar o potencial de transformação maligna destas lesões. Do ponto de vista epidemiológico tem sido possível demonstrar a relação entre os HPV de alto risco 16, 18, 31, 33, 45 e 56 e o potencial de transformação das lesões pela presença frequente nos cancros cervicais espinho-celulares e glandulares e nas lesões intra-epiteliais precursoras (Lorincz et al, 1999). No entanto, estes HPV são igualmente encontrados no epitélio normal.

A maspina inicialmente identificada no epitélio e nas células mioepiteliais normais da mama, tem sido alvo de investigação em vários tumores verificando-se uma perda da sua expressão em tumores em fase avançada como nos carcinomas da mama e da próstata (Shi et al., 2001, Maass et al., 2001, Umekita et al., 2002, Zou et al., 2002). Contudo, existem outras neoplasias onde se verifica uma elevada expressão da maspina como nos carcinomas do ovário, do pâncreas e do estômago (Sood et al., 2002, Oh YI et al., 2001, Maass et al., 2001, Son et al., 2002). Esta expressão paradoxal da maspina pode reflectir diferentes mecanismos na carcinogénese. A maspina não está expressa nas células normais do pâncreas, mas adquire essa expressão durante a carcinogénese (Fitzgerald et al., 2003), tal como as células epiteliais da superfície ovárica no carcinoma do ovário (Sood et al., 2002).

No presente estudo verificou-se que o epitélio normal do exocolo apresentava imunomarcagem da maspina em todas as camadas, sendo mais evidente na basal e intermédia e a nível do citoplasma e núcleo celulares. Este padrão foi também mais frequente nas lesões intra-epiteliais de baixo grau, realçando-se neste caso, a imunomarcagem ao nível da camada superficial, nomeadamente, nos núcleos dos kóilócitos talvez traduzindo a benignidade das lesões intra-epiteliais e reflectir o ciclo infeccioso vegetativo por HPV.

A média do *score* de imunomarcação da maspina foi tendencialmente menor nas lesões de alto grau havendo maior imunomarcação a nível nuclear, o que sugere um papel importante da maspina na carcinogénese ao nível da transcrição. Contudo esta é uma tendência que, para ser estatisticamente significativa, teria que envolver um estudo com maior número de doentes portadoras de lesões cervicais pré-neoplásicas. As lesões de alto grau que apresentaram elevada expressão da maspina, poderão corresponder hipoteticamente às que, no decurso da história natural das lesões intra-epiteliais, venham a regredir tendo em consideração os estudos já referidos que mostram a acção supressora tumoral da maspina.

As lesões de alto grau, como era esperado, foram as que apresentaram mais vezes a presença de HPV de alto risco relativamente às lesões de baixo grau. A expressão da maspina foi menor nas lesões associadas aos HPV de alto risco, embora esta diferença não seja estatisticamente significativa. Nas doentes com lesões de baixo grau e com HPV de alto risco, verificaram-se *scores* mais baixos de imunomarcação para a maspina. Quando o *score* foi ≤ 1 todas as doentes apresentavam HPV de alto risco, incluindo lesões de baixo e alto grau, sugerindo que a integração do genoma vírico nas células do epitélio cervical poderá conduzir à menor expressão da maspina através da inactivação da expressão da p53 pela acção do produto dos oncogenes E6, efeito já conhecido e consequência da integração do genoma vírico no genoma das células cervicais proliferativas. Foi demonstrado *in vitro* que a p53 activa a transcrição da sequência promotora da maspina pela ligação directa ao “*site*” da p53 *consensus-binding* (Zou et al., 2000). A provável inibição da maspina resultado da acção dos oncogenes E6, traduzir-se-á na menor imunomarcação da maspina nas lesões com HPV de alto risco, nomeadamente, do HPV 16.

Estes resultados permitem admitir que, independentemente do tipo de lesão cervical seja de baixo ou de alto grau, a expressão da maspina poderá revelar a potencial gravidade da infecção por HPV e, consequentemente, o potencial evolutivo da lesão provocada pelo HPV oncogénico.

As lesões intra-epiteliais caracterizam-se por perturbações na maturação e estratificação celulares e compreendem um vasto espectro de atipias celulares que, ocupando toda a espessura do epitélio, definem as lesões intra-epiteliais de alto grau. Ocorrendo infecção viral, o alvo é o queratinócito basal, verificando-se nas lesões de alto

grau uma abundante expressão dos genes E6 e E7 nas células em divisão. Nas lesões de baixo grau estes oncogenes, embora possam ser detectados nas células basais, a sua transcrição é abundante nas camadas espinhosa e granulosa do epitélio onde as células estão destinadas à diferenciação sem a actividade mitótica que caracteriza as células basais.

No presente estudo verificou-se que nas LSIL a expressão da maspina ocorre em todas as camadas epiteliais, excepto na basal, em 63,2% dos casos e, nas restantes 36,8%, a camada basal apresenta imunomarcação para a maspina. Duas lesões das 12 que não mostraram expressão da maspina na camada basal apresentavam HPV de alto risco 59 e 58, respectivamente. Todas as LSIL que mostravam expressão da maspina na camada basal estavam associadas a HPV de baixo risco ou não foi identificado DNA do HPV. Estes resultados parecem evidenciar uma tendência de lesões de baixo grau com imunomarcação da camada basal poderem estar associadas a HPV não oncogénicos e, desta forma, a uma provável evolução benigna das lesões intra-epiteliais.

Considerando o *score* de imunomarcação, a totalidade das lesões com $score \leq 1$ não expressa a maspina na camada basal mas, apenas, na intermédia. Em 42,8% das lesões intra-epiteliais de alto grau a maspina é expressa em todas as camadas do epitélio e em 50% não revelam imunomarcação na camada basal. Neste último grupo, as lesões estavam associadas a HPV de alto risco em 85,7% dos casos e a 13,3% aos de baixo risco ou sem identificação de HPV. No grupo de amostras de lesões de alto grau em que a expressão da maspina surge na camada basal, 71,4% estavam associadas ao HPV de alto risco e 28,6% a HPV de baixo risco ou não foi identificado DNA do HPV. Esta diferença significa uma tendência das lesões de alto grau expressarem a maspina na camada basal quando o HPV é de baixo risco ou não é identificado, carecendo de estudos de comprovação com um maior número de amostras.

Foram analisadas alterações no gene da maspina em 35 amostras de indivíduos saudáveis e 19 amostras de mulheres com patologia cervical. A análise dos resultados obtidos mostra que existem alterações na sequência do gene da maspina em zonas intrónicas, em exões e em zonas reguladoras. A maior parte das alterações detectadas encontra-se já descrita na base de dados de SNP. No entanto, dos 14 tipos de alteração encontrados, quatro não se encontram descritos na base de dados de SNP, dois dos quais em zonas reguladoras e os restantes no exão 6. O aparecimento de alterações em zonas

codificantes não se traduziu em alterações significativas no aminoácido correspondente na proteína, mesmo nas zonas de alteração não descritas como SNP.

A distribuição das alterações não aponta para uma prevalência evidente no grupo de indivíduos saudáveis ou no grupo de doentes. A análise de possíveis haplótipos associados com o aparecimento da doença revelou uma prevalência elevada de algumas alterações em conjunto, contudo, o perfil obtido não permitiu associar um determinado haplótipo ao aparecimento da doença.

Algumas das alterações encontradas na zona reguladora 3'UTR poderão permitir a ligação eventual de factores de transcrição diferentes, mas a informação carece de confirmação experimental.

5. Conclusões gerais

Da análise dos resultados obtidos neste trabalho poder-se-á concluir que as lesões intra-epiteliais cervicais de alto grau têm maior tendência para a menor expressão da mspina, que nestas lesões a mspina poderá ter imunomarcção em qualquer das camadas do epitélio, mas em 50% não envolve a basal estando, nestas circunstâncias, associadas mais frequentemente aos HPV de alto risco. Dada a história natural da infecção cervical por HPV em que as lesões mais graves com inserção do genoma vírico nas células ocorre no queratinócito basal, a ausência deste marcador anti-tumoral nesta camada do epitélio poderá corresponder a maior tendência para a progressão e gravidade das lesões intra-epiteliais.

6. Perspectivas futuras

O gradiente decrescente na expressão da mspina nas lesões cervicais intra-epiteliais de baixo para as lesões de alto grau, correspondeu parcialmente ao conhecimento actual sobre mecanismos de acção da mspina. No entanto, perspectivam-se novas possibilidades de investigação que exigirão a inclusão de maior número de doentes com lesões intra-epiteliais do colo uterino e com a avaliação de outros marcadores correlacionando-os com a expressão da mspina, como por exemplo, supressores tumorais p53 e pRb, alvos de inactivação como consequência da infecção do epitélio cervical por HPV oncogénicos.

Referências Bibliográficas

- Al-Ayyoubi M., Gettins P. G. W., Voiz K. 2004. Crystal structure of human maspin, a serpin with antitumor properties: reactive center loop of maspin is exposed but constrained. *J Biol Chem*; 279: 55540-55544.
- Bailey C.M., Khalkhali-Ellis Z., Seftor E. A., Hendrix M.J. C. 2006. Biological functions of maspin. *J Cell Physiol*; 209: 617-624.
- Beliakoff J., Whitesell L. 2004. *Anticanc Drugs* 15 (7): 651-662.
- Biliran H. Jr, Sheng S. 2001. Pleiotropic inhibition of pericellular urokinase-type plasminogen activator system by endogenous tumor suppressive maspin. *Cancer Res* 61: 8676-8682.
- Cher M. L., Biliran H. R., Bhagat S., Meng Y., Che M., Lockett J., Abrams J., Fridman R., Zachareas M., Sheng S. 2003. Maspin expression inhibits osteolysis, tumor growth and angiogenesis in a model of prostate cancer bone metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (13): 7847-7852.
- Chim S. S., Tong Y. K., Chiu R. W., Lau T. K., Leung T. N., Chan L. Y., Oudejans C. B., Ding C., Lo Y. M. 2005. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl. Acad Sci; USA* 102 (41): 14753-14758.
- Citri A., Kochupurakkal B. S., Yarden Y. 2004. The achilles heel of ErbB-2/HER 2: regulation by the Hsp90 chaperone machine and potential for pharmacological intervention. *Cell Cycle* 3 (1): 51-60.

- Cook J. A., Gius D., Wink D. A., Krishna M. C., Russo A., Mitchell J. B. 2004. Oxidative stress, redox, and the tumor microenvironment. *Semin Radiat Oncol* 14 (3): 259-266.
- Dachs G. U., Tozer G. M. 2000. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer* 36 (13 Spec N°): 1649-1660.
- Fitzgerald M., Oshario M., Holtan N., et al. 2003. Human pancreatic carcinoma cell activate maspin expression through loss of epigenetic control. *Neoplasia* 5: 427-436.
- Heighway J., Knapp T., Boyce L., Brennand S., Field J. K., Betticher D. C., Rastschiller D., Gugger M., Donovan M., Lasek A., Rickert P. 2002. Expression profiling of primary non-small cell lung cancer for target identification. *Oncogene* 21 (50): 7749-7763.
- Jiang N., Meng Y, Zhang S., Mensah-Osman E., Sheng S. 2002. Maspin sensitizes breast carcinoma cells to induced apoptosis. *Oncogene* 21 (26): 4089-4098.
- Jarboe E. A., Thompson L.C., Heinz D., McGregor J.L., Shroyer K. R. 2004. Telomerase and Human Papillomavirus as Diagnostic Adjuncts for Cervical Dysplasia and Carcinoma. *Human Pathol* 35 (4): 396.
- Katz A. B., Taichman L. B. 1999. A partial catalog of proteins secreted by epidermal keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol*; 112 (5): 818-821.
- Kondo S., Schutte B. C., Richardson R. J., Bjork B. C., Knight A. S., Watanabe Y., Howard E., de Lima R. L., Daack-Hirsch S., Sander A., McDonald-McGinn D. M., Zackai E. H., Lammer E. J., Aylsworth A. S., Ardinger H. H., Lidral A. C., Pober B. R., Moreno L., Arcos-Burgos M.,

- Valencia C., Houdayer C., Bahuau M., Moretti-Ferreira D., Richieri-Costa A., Dixon M. J., Murray J. C. 2002. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet* 32: 285-289.
- Lele S. M., Graves K., Gatalica Z. 2000. Immunohistochemical detection of maspin is a useful adjunct in distinguishing radial sclerosing lesion from tubular carcinoma of the breast. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 8 (1): 32-36.
- Li J. J., Colburn N. H., Oberley L. W. 1998. Maspin gene expression in tumor suppression induced by overexpressing manganese-containing superoxide dismutase cDNA in human breast cancer cells. *Carcinogenesis*; 19: 833-839.
- Liu Z., Shi H. Y., Nawaz Z., Zhang M. 2004. Tamoxifen induces the expression of maspin through estrogen receptor-alpha. *Cancer Lett* 209: 55-65.
- Liu J., Yin S., Reddy N., Spencer C., Sheng S. 2004a. Bax mediates the apoptosis-sensitizing effect of maspin. *Cancer Res* 64 (5): 1703-1711.
- Lockett J. Yin S., Li X., Meng Y., Sheng S. 2006. Tumor suppressive Maspin and epithelial homeostasis. *J Cell Biochem*; 97: 651-660.
- Lorincz A. T., Reid R., Jensen V. et al. 1999. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 79: 328-337.
- Lonardo F., Li X., Siddiq F., Singh R., Al-Abbadi M., Pass H. I., Sheng S. 2006. Maspin nuclear localization is linked to favourable morphological features in pulmonary adenocarcinoma. *Lung Cancer*; 51: 31-39.

- MacGowen R., Biliran H., Sager R., Sheng S. 2000. The surface of prostate carcinoma DU145 cells mediates the inhibition of urokinase-type plasminogen activator by maspin. *Cancer Res*; 60 (17): 47771-4778.
- Machtens S., Serth J., Bokemeyer C., Knuchel R., Kondo M., Jonas U., Kuczyk M. 2001. Expression of the p53 and Maspin protein in primary prostate cancer: correlation with clinical features. *Int J Cancer*; 95: 337-342.
- Maass N., Hojo T., Rosel F, et al. 2001. Down regulation of the tumor suppressor gene maspin in breast carcinoma is associated with a higher risk of distant metastasis. *Clin Biochem* 34: 303-307.
- Maass N., Hojo T., Ueding M., et al. 2001. Expression of the tumor suppressor gene maspin in human pancreatic cancers. *Clin Cancer Res* 7: 812-817.
- Maass N. L. R., Martin Z., Koichi N., Pierre R. 2002. Maspin locates to the nucleus in certain cell type. *J Pathol*. 197: 274-275.
- Mueller E., Sarraf P., Tontonoz P., Evans R. M., Martin K. J., Zhang M., Fletcher C., Singer S., Spiegelman B.M. 1998. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell*; 1(3): 465-470.
- Nickoloff B. J., Lingen M. W., Chang B.D., Swift M., Curry J., Bacon P., Bodner B., Roninson I. B. 2004. Tumor suppressor maspin is up-regulated during keratinocyte senescence, exerting a paracrine antiangiogenic activity. *Cancer Res* 64: 2956-2961.
- Odero-Marah V. A., Khalkhali-Ellis Z., Chunthapong J., Amir S., Seftor R. E., Seftor E. A., Hendrix M. J. 2003. Maspin regulates different signalling pathways for motility and adhesion in aggressive breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2: 398-403.

- Oh Y. L., Song S. Y., Ahn G. 2001. Expression of maspin in pancreatic neoplasms: application of maspin immunohistochemistry to the differential diagnosis. *Appl Immuno-histochem Mol Morphol* 7: 812-817.
- Padilla- Paz L. A. 2005. Emerging Technology in Cervical Cancer Screening: Status of Molecular Markers. In.: *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 48 (1): 218-225, Ed. Lippincott Williams & Wilkins..
- Pemberton P. A., Tipton A. R., Pavloff N., Smith J., Erickson J. R., Mouchabeck Z. M., Kiefer M. C. 1997. Maspin is an intracellular serpin that partitions into secretory vesicles and is present at the cell surface. *J Histochem Cytochem.*; 45: 1697-1706.
- Pervaiz S., Clement M. V. 2004. Tumor intracellular redox status and drug resistance—serendipity or a casual relationship? *Curr Pharm Des* 10 (16): 1969-1977.
- Pierson C. R., McGowen R., Grignon D., Sakr W., Dey J., Sheng S. 2002. Maspin is Up-Regulated in Premalignant Prostate Epithelia. *The Prostate*; 53 (4): 255-262.
- Schneider S. S., Schick C., Fish K. E., Miller E., Pena J. C., Treter S. D., Hui S. M., Silverman G. A. 1995. A serine proteinase inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (8): 3147-3151.
- Seftor R.E., Seftor E. A., Sheng S., Pemberton P. A., Sager R., Hendrix M. J. 1998. Maspin suppresses the invasive phenotype of breast carcinoma. *Cancer Res* 58: 5681-5685.

- Shao Z. M., Nguyen M., Alpaugh M. L., O`Connell J. T., Barsky S. H. 1998. The human myoepithelial cell exerts antiproliferative effects on breast carcinoma cells characterized by p21WAP1/C1P1 induction, G2/M arrest, and apoptosis. *Exp Cell Res*; 241: 394-403.
- Sheng S. 2004. The promise and challenge toward the clinical application of maspin in cancer. *Front Biosci* 9: 2733-2745.
- Sheng S. 2006. A role of novel serpin maspin in tumor progression: the divergence revealed through efforts to converge. *J Cell Physiol*. 209: 631-635.
- Shi H. Y., Zhang W., Liang R. et al. 2001. Blocking tumor growth, invasion and metastasis by maspin in a syngeneic breast cancer model. *Cancer Res* 61: 6945-6951.
- Shi H. Y., Liang R., Templeton N. S., Zhang M. 2002. Inhibition of breast tumor progression by systemic delivery of the maspin gene in syngeneic tumor model. *Mol Ther* 5: 755-761.
- Shi H. Y., Zhang W., Liang R., Kittrell F., Templeton N. S., Medina D., Zhang M. 2003. Modelling human breast cancer metastasis in mice: maspin as a paradigm. *Histol Histopathol* 18: 201-206.
- Shi H., Shi X., Liu K. J. 2004. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 255 (1-2): 67-78.
- Smith S. L., Watson S. G., Ratschiller D., Gugger M., Betticher D. C., Heighway J. 2003. Maspin – the most commonly expressed gene of the 18q21.3 serpin cluster in lung cancer – is strongly expressed in preneoplastic bronchial lesions. *Oncogene*. 22 (54): 8677-8687.

- Solomon L. A., Mubkarah A. R., Schimp V. L., Arabi M. H., Morris R. T., Nassar H., Ali-Fehmi R. 2006. Maspin expression and localization impact on angiogenesis and prognosis in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 101: 385-389.
- Son H. J., Sohn T. S., Song S. Y., et al. 2002. Maspin expression in human gastric adenocarcinoma. *Pathol Int* 52: 508-513.
- Sood A. K., Fletcher M. S., Gruman L. M., Coffin J. E., Jabbari S., Khalkhali-Ellis Z., Arbour N., Seftor E. A., Hendrix M. J. 2002. The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res.* 8: 2924-2932.
- Sreedhar A. S., Soti C., Csermely P. 2004. Inhibition of Hsp90: a new strategy for inhibiting protein kinases. *Biochim Biophys Acta* 1697 (1-2): 233-242.
- Tanaka N., Ishihara M., Kitagawa M., Harada H., Kimura T., Matsuyama T., Lamphier M. S., Aizawa S., Mak T. W., Taniguchi T. 1994. Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1. *Cell* 77: 829-839.
- Umekita y., Ohi Y., Sagara Y., ale t. 2002. Expression of maspin predicts poor prognosis in breast-cancer patients. *Int J Cancer* 100: 452-455.
- Waggoner S. E., Chernicky C. L. 2004. Molecular Biology of Cervical and Vulvar Carcinoma. 2004. In.: *Gynecologic Cancer: Controversies in Management*. Gersheuson, Mcguire, Quinn Thomas (eds), cap.4, pp 65-77. Elsevier Churchill Livingstone, Elsevier Ltd.
- Wang S. S., Hildesheim A. J. 2003. Viral and Host factors in Human papillomavirus persistence and progression. *Natl Cancer Inst* 31: 35-40.

- Wong Y.F., Cheung T. H., Lo K. W. K., Wang V. W., Chan C. S., Ng T. B., Mok S. C. 2004. Protein profiling of cervical cancer by protein – biochips – proteomic scoring to discriminate cervical cancer from normal cervix. *Cancer Lett*; 211: 227-234.
- Yin S., Lockett J., Meng Y., Biliran H Jr, Blouse G. E., Li X., Reddy N., Zhao Z., Lin X., Anagli J., Cher M. L., Sheng S. 2006. Maspin retards cell detachment via a novel interaction with the urokinase-type plasminogen activator/urokinase-type plasminogen activator receptor system. *Cancer Res* 66: 4173-4181.
- Zamir E., Geiger B. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 114 (PT 20): 3583-3590.
- Zhang M., Shi Y., Magit D., Furth P. A., Sager R. 2000a. Reduced mammary tumor progression in WAP-Tag/WAP-maspin bitransgenic mice. *Oncogene* 19: 6053-6058.
- Zhang M., Volpert O., Shi Y. H., Bouck N. 2000b. Maspin is an angiogenesis inhibitor. *Nat Med* 6: 196-199.
- Zhang H., Burrows F. 2004. Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. *J Mol Med* 82 (8): 488-499
- Zou Z., Anisowicz A., Hendrix M. J., Thor A., Neveu M., Sheng S., Rafidi K., Seftor E., Sager R. 1994. Maspin a Serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science* 263 (5146): 526-529.

Referências Bibliográficas

Zou Z., Gao C., Nagaich A. K., Connell T., Saito S., Moul J. W., Seth P., Appella E., Srivastava S. 2000. p53 regulates the expression of tumor suppressor gene maspin. *J Biol Chem*; 275: 6051-6054.

Zou Z., Zhang W., Young D., et al. 2002. Maspin expression profile in human prostate cancer (Cap) and *in vitro* induction of maspin expression by androgen ablation. *Clin Cancer Res* 8: 1172-1177.