

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

LUCIANO FERNANDES LOURES

**EXPRESSÃO DO GENE PTEN: AVALIAÇÃO IMUNO-
HISTOQUÍMICA, SEQUENCIAMENTO GENÉTICO E
ASSOCIAÇÃO COM p53, Ki-67 E CD31 EM PACIENTES COM
CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO.**

Belo Horizonte

2012

LUCIANO FERNANDES LOURES

**EXPRESSÃO DO GENE PTEN: AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA,
SEQUENCIAMENTO GENÉTICO E ASSOCIAÇÃO COM p53, Ki-67 E CD31
EM PACIENTES COM CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina/UFMG Saúde da Mulher, Área de Concentração: Reprodução Humana e Patologia Ginecológica para obtenção do título de Mestre em Saúde da Mulher.

Orientador: Professor Agnaldo
Lopes da Silva Filho

Coorientadora: Professora Paula
Viera Teixeira Vidigal

Belo Horizonte

2012

Dedicatória

Dedico esta tese,

*À minha esposa Ivy, pelo amor, pela cumplicidade diária e porque
tudo fica mais fácil quando estou ao seu lado;*

*Aos meus pais, por terem me ensinado com dedicação e amor os
primeiros passos e pelo incentivo em toda caminhada;*

À minha irmã Luciene pelo carinho incondicional.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Agnaldo Lopes da Silva Filho, pela oportunidade de ser seu orientando e pelo inspirador convívio no ambulatório e bloco cirúrgico. O seu exemplo como médico e professor foi o maior ensino.

À minha coorientadora Professora Paula Vidigal pela paciência, disponibilidade e pelo apoio fundamental para a conclusão deste trabalho.

À minha amiga Mariana Seabra pelo companheirismo no Mestrado e nos primeiros passos da vida profissional. Tenho grande admiração pelo seu caráter e competência.

Ao Professor Henrique Vitor Leite e à Gerente do Centro de Saúde Rio Branco Andréia Helena de Moraes pelo incentivo e compreensão.

A todos os meus alunos do sétimo período da Universidade Federal de Minas Gerais: ensinar e aprender com vocês me motiva.

“A IGNORÂNCIA AFIRMA OU NEGA VEEMENTEMENTE; A CIÊNCIA DUVIDA.”

(VOLTAIRE)

Índice

Resumo

Lista de Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

1. Introdução.....	13
1.1. Epidemiologia do Câncer de Colo do Útero.....	14
1.2. HPV e Câncer do Colo do Útero.....	14
1.3. Carcinogênese do Colo do Útero.....	15
1.3.1. O Gene p53.....	16
1.3.2. Proliferação Celular.....	16
1.3.3. Angiogênese.....	17
1.4. PTEN.....	18
2. Objetivos.....	21
3. Materiais e Métodos.....	23
3.1. Critérios de Inclusão.....	24
3.2. Obtenção das Amostras.....	25
3.3. Imuno-histoquímica.....	26
3.4. Análise da imuno-marcação do PTEN.....	27
3.5. Análise da imuno-marcação de p53, Ki-67 e CD31.....	28
3.6. Análise Estatística.....	28

4. Artigo.....	29
4.1. Introduction.....	30
4.2. Materials and Methods.....	31
4.3. Results.....	35
4.4. Discussion.....	36
4.5. Tables and Figures Legends.....	40
4.6. References.....	44
5. Considerações finais.....	49
6. Referências Bibliográficas.....	51
7. Anexos.....	59
7.1. Anexo I: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	60
7.2. Anexo II: Estadiamento do Câncer de Colo Uterino (FIGO).....	62
7.3. Anexo III: Descrição Cirúrgica da Histerectomia Radical.....	64

LISTA DE SIGLAS

ACOG: The American College of Obstetricians and Gynecologists

CCE: Carcinoma de células escamosas

cm: centímetros

CSCC: cervical squamouscell carcinoma

COEP: Comitê de Ética em Pesquisa

DNA: ácido desoxirribonucleico

FIGO: Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

G0: Fase do ciclo celular em que a célula permanece indefinidamente na intérfase

G1: Fase do ciclo celular durante a intérfase, após citocinese e antes da fase S

G2: Intervalo entre a duplicação do DNA e o início da divisão celular

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio (Água oxigenada)

HPV: Human Papiloma Virus

IHQ: Imuno-histoquímica

INCA: Instituto Nacional do Câncer

mm: milímetros

NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

S: síntese. Fase do ciclo celular em que ocorre a duplicação do DNA.

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE FIGURAS

1. **FIGURA 1:** Desenho esquemático da ação do PTEN sobre o PIP3.....18
2. **FIGURA 2: “Figure 1” do artigo** - Photomicrographs of a squamous cell carcinoma with PTEN nuclear immunostaining in normal cervical epithelium (A) and cervical SCC (B). The markup is brown. Note the reduction in intensity of expression in the CSCC as compared to control. 400X magnification.....41
3. **FIGURA 3: “Figure 2” do artigo** -Expression of PTEN intensity in benign cervix (control group) and in the tumor (study group).Note: Differences between groups were assessed by t student test (two groups).....41
4. **FIGURA 4: “Figure 3” do artigo** -Association between PTEN expression and p53 (A), CD31(B) and Ki-67 (C) tumor expression in patients with squamous cell carcinoma of the cervix.42

LISTA DE TABELAS

- 1. TABELA 1:**Association of tumor size, grade of differentiation, presence of lymphatic vascular invasion, parametrium involvement and pelvic lymph node metastasis with tumor PTEN expression in patients with squamous cell carcinoma of the cervix.....40

Resumo

Introdução: O processo de carcinogênese do colo do útero compreende a inativação de genes supressores tumorais a partir da interação da célula afetada pelo o Papilomavírus humano (HPV). Este estudo analisa a expressão da proteína PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) em pacientes com carcinoma invasor do colo uterino.

Materiais e Métodos: Foram incluídas no estudo 20 mulheres com diagnóstico de Carcinoma de Células Escamosas (CCE) invasor de colo uterino em estágio IB (casos) submetidas a tratamento cirúrgico e 20 mulheres com mioma uterino (controles) submetidas a histerectomia vaginal. Amostras de tumor e colo normal foram retiradas para avaliação histológica e marcação imuno-histoquímica (IHQ) das proteínas PTEN, p53, Ki-67 e CD31, além do seqüenciamento genético do PTEN. Os dados foram analisados através do teste de qui - quadrado (χ^2). O nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

Resultados: A diminuição da imuno-marcação da expressão do PTEN nos casos foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$). A média da intensidade de expressão foi de 150,52 nas amostras de câncer de colo uterino e de 204,12 nos epitélios normais. Nenhuma mutação no seqüenciamento genético dos

nove exons do PTEN foi encontrada. Não houve associação estatisticamente significativa entre a expressão do PTEN e a expressão do p53 ($p=0,969$), Ki-67 ($p=0,283$) e CD31 ($p=0,817$) ou fatores prognósticos anátomo-clínicos nas pacientes com carcinoma invasor do colo uterino.

Conclusão: Este estudo mostrou que o PTEN pode estar envolvido na carcinogênese cervical mesmo na ausência de alterações no seqüenciamento genético. Não houve associação entre o PTEN e p53 e os marcadores de angiogênese e proliferação celular.

Palavras-Chave: Câncer invasor do colo uterino, imuno-histoquímica, gene supressor tumoral, PTEN.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia do Câncer de Colo do Útero

O câncer de colo do útero é um importante problema de saúde pública. Trata-se do terceiro tipo de câncer mais comum entre mulheres, com 529 mil casos novos em 2008⁽¹⁾. A distância entre países desenvolvidos e em desenvolvimento fica evidente nos números referentes à incidência e mortalidade deste câncer. Os países em desenvolvimento possuem uma incidência duas vezes superior aos países desenvolvidos. Em 2008, o câncer de colo do útero foi responsável pelo óbito de 275 mil mulheres no mundo sendo que destes, 85% foram de mulheres de países em desenvolvimento⁽¹⁾.

O Brasil faz parte do grupo de países que ainda apresenta o câncer de colo do útero como um desafio na saúde pública. São esperados 17.540 novos casos para o ano de 2012, com um risco 17 casos a cada 10.000 mulheres⁽²⁾. Trata-se do segundo tipo primário de câncer mais prevalente em mulheres no país.

1.2. HPV e Câncer do Colo de Útero

A possibilidade da prevenção eficaz é baseada no conhecimento do agente etiológico e de seu meio de transmissão. O papilomavírus humano (HPV), que é sexualmente transmissível, está presente em 99% dos casos de câncer de colo^(3, 4).

A infecção persistente pelo HPV tem papel importante na carcinogênese do colo do útero, sendo o principal fator etiológico no desenvolvimento da doença ^(5, 6). Entretanto, nem toda a paciente infectada com HPV de alto grau desenvolve câncer. Pode-se dizer que a infecção é necessária, mas insuficiente para o processo carcinogênico ^(5, 7). A infecção pelo HPV seria apenas a condição inicial para o desenvolvimento do câncer de colo uterino, seguida de eventos que, impulsionados pela divisão celular, se acumulariam ao longo do tempo ⁽⁸⁾. Esses eventos levam a perda do controle da multiplicação celular, à instabilidade genômica e à falha nos mecanismos de controle do ciclo celular ⁽⁹⁾.

1.3. Carcinogênese do colo do útero

O HPV possui em sua estrutura oncoproteínas (E6 e E7) que são fatores virais responsáveis por proporcionar instabilidade genética nas células afetadas. Foi demonstrado que essas oncoproteínas interferem nas vias de ação de alguns genes supressores de tumor ⁽¹⁰⁾. Sabe-se que a oncoproteína E6 produzida pelo papilomavírus liga-se à p53, estabilizando-a e impedindo sua degradação, o que provoca o acúmulo celular da mesma. Alguns estudos têm demonstrado que esse acúmulo leva a um comportamento agressivo de alguns tumores, com a tendência a metástases à distância e a diminuição da sobrevida ⁽¹¹⁾. Alterações de genes supressores de tumor, ou de suas respectivas proteínas, podem ser responsáveis por tais processos carcinogênicos.

1.3.1. O gene p53

O gene p53 foi o primeiro gene supressor tumoral a ser identificado e a perda de sua função é o evento genético mais frequentemente descrito em cânceres humanos. Esse gene codifica uma fosfoproteína nuclear, também chamada p53, que possui importantes funções no controle do ciclo celular, no reparo do DNA e na indução da apoptose ^(12, 13).

O gene p53 é ativado após a lesão do DNA por agentes físicos, como radiação ultravioleta e raios gama, produtos químicos mutagênicos ou infecções virais, levando a transcrição da sua proteína. O acúmulo dessa proteína no núcleo da célula inibe o ciclo mitótico no início da fase G1 e ativa a transcrição de genes de reparo do DNA, impedindo a propagação do erro genético às células - filhas. Caso o reparo do DNA não ocorra de forma satisfatória, a p53 induz a apoptose celular ⁽¹⁴⁾. O sistema de funcionamento do gene p53 é ativado na presença de agressões celulares.

No câncer de colo uterino, alguns estudos sugerem que a expressão da proteína p53 e o aumento da atividade mitótica são eventos progressivos no processo de carcinogênese ^(11, 15). Contudo, o valor da expressão da proteína p53 como marcador prognóstico ainda é controversa ^(16, 17).

1.3.2. Proliferação Celular

Os processos reguladores da carcinogênese interferem diretamente ou indiretamente na proliferação celular ^(18, 19). As células em proliferação expressam em seus núcleos uma proteína não-histônica, de meia-vida curta, chamada Ki-67. Essa proteína está presente em todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M), exceto na G0 e reage com o anticorpo monoclonal de camundongo MIB-1 ⁽²⁰⁻²²⁾.

No epitélio escamoso cervical normal, a expressão de Ki-67 limita-se às células em proliferação basais e parabasais. Nas displasias e no carcinoma, no entanto, observa-se um aumento do número de células com expressão positiva para essa proteína e uma extensão da positividade da marcação acima de um terço do epitélio cervical. Há ainda associação entre o grau de lesão intraepitelial escamosa e a intensidade da marcação celular ⁽²³⁾.

A expressão da proteína Ki-67 já foi associada ao tamanho tumoral, disseminação linfática e sobrevida livre de doença no câncer de colo uterino ⁽²⁰⁾. Também já foi observada associação entre menor sobrevida e maior expressão tumoral de Ki-67 nas pacientes com CCE de colo uterino ^(24, 25).

1.3.3. Angiogênese

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de uma rede vascular pré-existente.

Os tumores sólidos requerem angiogênese para seu crescimento, invasão e disseminação metastática. Por esse motivo, pode ser um indicador prognóstico, desempenhando importante papel na progressão tumoral e na sobrevida das pacientes com câncer ginecológico ⁽²⁶⁾.

A avaliação da angiogênese pode ser realizada através de vários marcadores de células endoteliais, entre eles o CD31 ⁽²⁷⁾. Estudos anteriores que avaliaram CD31, em estágios iniciais do câncer de colo uterino, mostraram que existe associação entre a expressão do CD31 e parâmetros histopatológicos de prognóstico, como invasão linfovascular e tamanho tumoral ⁽¹⁶⁾. Mais recentemente, evidenciou-se que a expressão do CD31, como marcador de angiogênese, está associada a um maior tempo de sobrevida livre

da doença e a uma maior sobrevida global, indicando esse marcador como fator prognóstico de pior prognóstico independente no câncer cervical inicial ⁽²⁸⁾.

1.4. PTEN

O PTEN (*Phosphataseandtensin*homolog), identificado em 1997, é um gene do cromossomo 10 (10q23.3) com importante função no controle do crescimento e divisão celular, promoção de apoptose e regulação da adesão e migração celular^(10, 29, 30). Codifica uma fosfatase de ação lipídica e protéica cuja função mais estudada é converter o fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PIP3) em fosfatidilinositol (4,5) bifosfato (PIP2), antagonizando a atividade da PI3 kinase (PI3K) ⁽³¹⁻³⁴⁾. Essa inativação resulta na manutenção da síntese protéica e progressão do ciclo celular. (Figura 1)

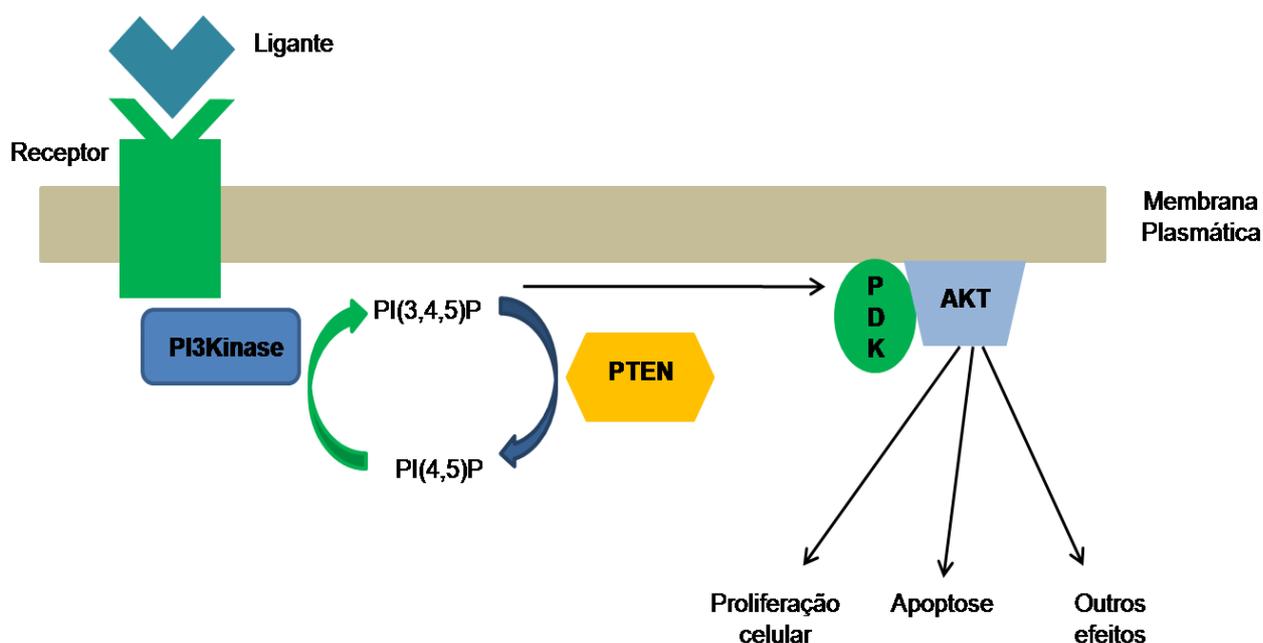


Figura 1: Desenho esquemático da ação do PTEN sobre o PIP3. A fosfatase lipídica do PTEN citoplasmático desfosforila o PIP3 resultando em concomitante diminuição da atividade do AKT.

A supressão da função PTEN resulta na ativação do PI3K com consequente produção de PIP3. A ligação de fatores de crescimento aos receptores de membrana celular aumenta o PIP-3 que ativa o complexo AKT e promove a proliferação celular. Inversamente, a elevação na proteína PTEN reduz os níveis de PIP-3 e AKT fosforilado, induzindo assim a apoptose. O PTEN, portanto, desempenha um papel importante na modulação do ciclo celular e/ou apoptose ^(30, 35). Existem, no entanto, mecanismos alternativos do PTEN no controle da carcinogênese, possivelmente independentes da AKT. Tem sido demonstrada uma associação direta entre o PTEN e o p53 na elevação da transcrição e de níveis protéicos bem como manutenção da estabilidade celular ^(36, 37).

A região cromossômica 10q23.3 é freqüentemente relacionada a perda da heterozigose, fator que predispõe a carcinogênese de uma série de neoplasias como o glioma ⁽³⁸⁾, cérebro ⁽³⁹⁾, próstata ⁽³⁹⁾, mama ⁽³⁹⁾, tireóide ⁽⁴⁰⁾, endométrio ⁽⁴¹⁻⁴³⁾.

Mutações ou deleções são os mecanismos de inativação da supressão tumoral mais comuns. Porém, há controvérsias na literatura quanto à perda da heterozigose do PTEN para o câncer de células escamosas da cabeça, do

pescoço e do colo uterino, uma vez que tais alterações são encontradas por alguns autores⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾ e por outros não são identificadas^(37, 48, 49).

Alterações estruturais genéticas no DNA não são os únicos mecanismos que resultam na diminuição da função do gene. Alterações epigenéticas são mudanças na expressão genética que ocorrem sem que haja mudanças na seqüência do DNA, porém são capazes de regular a dinâmica da expressão genética⁽⁵⁰⁾. Os processos responsáveis pela regulação epigenética são a metilação do DNA e modificações nas histonas (metilação, fosforilação e acetilação)⁽⁵¹⁾.

A metilação consiste transferência de um agrupamento metil (CH₃) da S-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina (5-MeC), que geralmente precede a uma guanina (dinucleotídeo CpG), pela ação de uma família de enzimas que recebe o nome de DNA metiltransferase (DNMT)⁽⁵²⁾. A presença do agrupamento metil sobre uma citosina que precede a uma guanina pode inibir a ligação de fatores de transcrição a essas regiões resultando na ausência de transcrição gênica.

A atuação do PTEN no CCE de colo do útero é controversa e com isso, muito se tem pesquisado sobre os mecanismos envolvidos na supressão do PTEN e a carcinogênese do colo uterino. Diante dessa lacuna na literatura fica imperativo o estudo do PTEN e suas proteínas no carcinoma cervical.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Avaliar a expressão da proteína PTEN no colo uterino em pacientes após histerectomia radical por CCE do colo uterino em comparação a pacientes submetidas a histerectomia por miomatose uterina.

ObjetivosEspecíficos

- Comparar oseqüenciamento genético do PTEN no CCE invasor de colo uterino, de pacientes submetidas a histerectomia radical, e no colo normal, de pacientes operadas por mioma uterino.
- Avaliar a associação da proteína PTEN no tumor com o grau de diferenciação, com a presença de invasão linfovascular, com o tamanho tumoral, com o acometimento parametrial e com presença de metástases em lifonodos pélvicos nas pacientes com CCE invasor do colo uterino.
- Avaliar a correlação entre a expressão das proteínas PTEN e p53, CD31 e Ki-67 no CCE invasor de colo uterino.

3. *MATERIAIS E MÉTODOS*

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (Parecer 135/02).

Após, o preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I) as pacientes foram incluídas no estudo e divididas em 02 grupos:

- **Grupo 1 (casos):** 20 mulheres com diagnóstico de carcinoma de células escamosas do colo uterino em estágio IB acompanhadas no Serviço de Oncoginecologia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas (UFMG).
- **Grupo 2 (controles):** 20 mulheres com mioma uterino atendidas no ambulatório de Ginecologia Cirúrgica do mesmo hospital.

3.1. Critérios de Inclusão

- Pacientes com diagnóstico de CCE invasor do colo uterino, estadiamento IB da FIGO com indicação de histerectomia radical e sem história de radioterapia e/ou quimioterapia prévias (casos).
- Pacientes com mioma uterino e indicação de histerectomia vaginal, avaliadas previamente por citologia oncótica e colposcopia, sem evidências de NIC ou carcinoma invasor do colo uterino (grupo controle).
- Ausência de sinais sugestivos de processos infecciosos agudos no colo uterino.
- Termo de Consentimento livre e esclarecido preenchido e assinado.

O estadiamento clínico do tumor foi definido pré-operatoriamente, após a indução anestésica, e através do exame da pelve, conforme recomendado pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) ^(53, 54).

As pacientes com câncer de colo uterino foram submetidas à laparotomia mediana com realização de inventário da cavidade abdominal, histerectomia radical classe III Rutledge-Piver e linfadenectomia pélvica ⁽⁵⁵⁾(Anexo III). O tratamento cirúrgico foi o primeiro a ser adotado e nenhuma das pacientes foi submetida à radioterapia ou quimioterapia antes da cirurgia.

As pacientes com mioma uterino foram submetidas a histerectomia de acordo com a técnica modificada de Heaney ⁽⁵⁶⁾.

3.2. Obtenção das amostras

Foram removidas do material cirúrgico quatro amostras medindo 0,5x0,5 cm, todas retiradas de áreas não necróticas, Em seguida os exemplares foram fixados em formalina neutra tamponada 10% e enviados ao serviço de Anatomia Patológica da UFMG. A avaliação histológica de todas as amostras foi realizada por dois patologistas de acordo com as recomendações da Sociedade America de Patologistas ⁽⁵⁷⁾. Foram avaliados o tamanho do tumor, a classificação, o grau de diferenciação (G1, G2, G3), a invasão linfovascular, o envolvimento vaginal e parametrial e a presença metástases em linfonodos pélvicos.

3.3. Imuno-histoquímica

As amostras retiradas do colo uterino normal e neoplásico foram estudadas através da técnica de IHQ. Foram avaliadas as expressões das

proteínas PTEN (Upstate, USA), p53 (clone DO7, DAKO), ki-67 (clone MIB-1, DAKO) e CD 31 (clone JC/70A, DAKO).

As amostras foram desidratadas em série crescente de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Posteriormente foram cortadas (espessura de 4,0 μ m), fixadas em lâminas e coradas com Hematoxilina & Eosina. A avaliação histológica de todas as amostras foi realizada pelo mesmo patologista de acordo com as recomendações da Sociedade America de Patologistas ⁽⁵⁷⁾. Esta análise é realizada com a determinação do tamanho do tumor, da classificação do grau de diferenciação (G1, G2, G3), da presença ou ausência de invasão do espaço vículo-linfático (LVSI), do envolvimento vaginal e parametrial, e da presença de linfonodos pélvicos metastáticos.

O tumor foi considerado bem diferenciado (grau 1), moderadamente diferenciado (grau 2) e pouco diferenciado (grau 3). Para LVSI considerou-se invasão linfática quando havia células neoplásicas compactas associadas ou não a linfócitos, no interior do espaço luminal recoberto com células endoteliais achatadas. Para invasão vascular considerou-se a presença de células neoplásicas associadas a eritrócitos no lume de vasos sanguíneos. Para ser definido como LVSI deveria haver invasão linfática e/ou vascular, além de adesão à parede vascular e presença de expansão luminal.

Os cortes das amostras foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol. A seguir, foram mergulhados em solução de EDTA 1mM (pH 8,0), e aquecidos a 96⁰C em vaporizador steamer por 30 minutos, para a recuperação antigênica. Após resfriamento e lavagem dos cortes em tampão TRIS, Tris-HCl 0,05M (pH 7,6), eles foram tratados com solução de

H₂O₂ a 3%, fundamental na inativação da peroxidase endógena. Nova lavagem com TRIS foi feita para que, em seguida, os cortes fossem incubados com os anticorpos primários anti-PTEN (Novocastra, Reino Unido) diluído a 1:500. Foram utilizados anticorpos monoclonais de camundongo para a pesquisa do p53 (anti-p53 em diluição 1:300), Ki-67 (MIB-1 na diluição 1:100) e CD31 (anti-CD-31 na diluição 1:40). Para controle negativo da imuno-marcação, foi utilizado apenas TRIS. Essa incubação durou uma noite e foi mantida a 4°C em câmara úmida. Após lavagem em TRIS, as secções foram expostas à solução pós-primária, kit NovoLink™ Max Polymer (Novocastra, Reino Unido). Nova lavagem precedeu a exposição dos cortes ao polímero, kit NovoLink™ Max Polymer, fundamental para a amplificação da resposta. A imuno-reação foi visualizada usando diaminobenzidina - DAB, kit Liquid DAB + SubstrateChromogen System (DakoCytomation, Estados Unidos), que foi preparado de acordo com as orientações do fabricante. Ao final, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, desidratados, diafanizados e montados.

3.4. Análise da Imuno-marcação de PTEN

Para analisar e quantificar a intensidade de imuno-expressão da proteína PTEN no núcleo das células cancerosas, foram obtidas imagens digitais dos cortes IHQ, utilizando microscópio Leica DM LB 100T. Foram fotografadas, aleatoriamente, 10 áreas de cada lâmina, por paciente. As imagens foram capturadas pelo programa Leica IM50, versão 4.0, e processadas no programa Adobe Photoshop, versão 9.0.2. O processamento das imagens foi feito da seguinte forma: primeiramente foram convertidas para

escala de cinza e, posteriormente, invertidas. Então, as imagens foram importadas para o programa Image Tool, versão 3.0, onde os núcleos de 100 células, por paciente, foram submetidos à quantificação de coloração. A medida da intensidade da coloração dos núcleos procedeu-se com os seguintes critérios: um núcleo era escolhido, aleatoriamente, e a partir dele os nove núcleos consecutivos eram quantificados. Foram desconsiderados os núcleos que não estivessem com forma e foco bem definidos.

3.5. Análise da imuno-marcação de p53, Ki-67 e CD31

A expressão da proteína p53, o índice de proliferação celular (Ki-67) e a angiogênese (CD31) foram avaliados em cortes histológicos pela técnica IHQ nas amostras do tumor ou colo uterino. Os anticorpos monoclonais empregados foram o anti-p53 contra a proteína p53, o MIB-1 contra o antígeno nuclear presente em fase de proliferação, e o anti-CD31 contra as células endoteliais.

3.6. Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o software SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os dados foram analisados através da estatística descritiva e através do teste de qui - quadrado (χ^2) para avaliar diferenças significativas entre dois grupos. O nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$. O cálculo amostral para o estudo mostrou uma margem de erro de 5% e um poder estatístico de 80%.

4. ARTIGO

4. ARTIGO

“Expression of PTEN in patients with carcinoma of the cervix and its association with p53, Ki-67 and CD31”

Key-words: Cervical neoplasia; immunohistochemistry; tumor suppressor gene; PTEN.

4.1. Introduction

Cervical cancer is a world-wide public health problem, with an annual incidence rate of 530,232 new cases and 275,008 deaths ⁽¹⁾. Most cases occur in undeveloped countries where no effective screening systems are available ⁽²⁾. In Brazil, 17,540 new cases are estimated to occur in 2012, making it the third most common malignancy and the fourth leading cause of death among women ⁽³⁾.

Persistent infection with human papillomavirus (HPV) plays a critical role in cervical carcinogenesis. However, HPV infection alone is not sufficient to induce malignant transformation, and additional genetic or epigenetic changes in tumor cells are required ^(4, 5). The development and progression of cervical squamous cell carcinoma (CSCC) are likely to be associated with the loss of growth suppression, increased cell growth rates, and angiogenesis ^(6,7). These combinations of genetic abnormalities generate cells that divide more rapidly or

evade cell death, thus liberating them from growth control and cell cycle checkpoints.

PTEN (phosphatase and tensin homolog) is a tumor suppressor gene localized on chromosome 10 (10q23.3) in a chromosome region that is often related to loss of heterozygosity and a consequent predisposition to carcinogenesis in a number of malignancies⁽⁸⁻¹⁰⁾. Genetic, epigenetic and protein expression alterations in PTEN have been described in several types of tumors such as brain, prostate, breast, thyroid and endometrial tumors⁽¹¹⁻¹⁴⁾. PTEN phosphatase is a negative regulator of the Akt/PKB survival pathway, which is over-expressed in CSCC⁽¹⁵⁾. Mutations are common in many human cancers, but the presence of a loss of heterozygosity, genomic deletion and punctual mutations in PTEN and their associations with squamous cells carcinoma are controversial⁽¹⁵⁻¹⁹⁾.

The role of PTEN in cervical carcinogenesis has not been clearly determined, and there is no general agreement about the mechanism related to the reduction of PTEN expression in cervical cancer⁽²⁰⁾. Therefore, the purpose of this study was to investigate protein expression and mutations in PTEN in patients with stage IB CSCC and the association with clinicopathologic features, tumor p53 expression, cell proliferation and angiogenesis.

4.2. Materials and Methods

Women with stage IB CSCC (n=20) (study group) and uterine myoma (n=20) (control group), aged 49.1 ± 1.7 years (Mean \pm SEM, range 27-78 years), were prospectively evaluated. The study was performed in accordance with the

Ethical Committee for Research in Human Beings guidelines of the institution.

Informed consent was obtained from all included patients.

Patients with CSCC underwent a class III Rutledge-Piver radical hysterectomy and a pelvic lymphadenectomy. This was the primary treatment for all patients because none had previously been treated with radiotherapy and/or chemotherapy. The clinical stage was defined preoperatively by a pelvic examination under general anesthesia according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) recommendations^(21, 22). A vaginal hysterectomy was performed for uterine myomas according to the modified Heaney technique.

Tissue samples were fixed in 10% neutral-buffered formalin, embedded in paraffin, and stained with hematoxylin and eosin for histological evaluation. Histological specimens were analyzed by the same pathologists according to the recommendations of the American Society of Pathologists⁽²³⁾. Clinicopathologic characteristics, such as tumor size, differentiation grade, lymphatic vascular invasion (LVSI), parametrial involvement and pelvic lymph node status, were recorded.

Immunohistochemistry

Tissue sections from CSCC and normal mucosa were stained with PTEN (Upstate, USA), p53 (clone DO7, DAKO), Ki-67 (clone MIB-1, DAKO) and CD31 (clone JC/70A, DAKO) antiserum. Briefly, 4 µm paraffin-embedded sections were deparaffinized in xylene and hydrated with graded ethanol solutions. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% H₂O₂ in water

for 10 min. Heat-induced epitope retrieval was performed with 1 mM EDTA buffer (pH 8.0) for 30 min in a steamer at 96°C. Primary polyclonal rabbit antiserum was used at a 1:100 dilution for PTEN, p53, and Ki-67 antiserum and a 1:40 dilution for CD31 antiserum for 18 h at 4°C. This was followed by incubation with a labeled streptavidin-biotin kit, the NovoLink™ Max Polymer Detection System (Novocastra, United Kingdom). Peroxidase activity was developed with DAB (Sigma, St Louis, MI) with timed monitoring using a positive control sample. The sections were then counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted.

Analysis of PTEN staining

The intensity of PTEN immunostaining was estimated by computer-assisted image analysis, based on previously reported protocols. Pictures from 10 different fields of each sample were taken by a Leica DMLB microscope and digitalized using the Leica IM50 program, version 4.0. Digital images were processed with Adobe Photoshop (Adobe Systems, US), converted to grayscale and inverted. The images were then exported to Image-Tool software (version 3.0, University of Texas Health Science Center, San Antonio, US) for quantitative analysis. For this proposal, 10 epithelial cell nuclei from 10 different fields, totaling 100 nuclei from each patient, were traced and had their area measured. The pixel intensity was determined for the traced areas. For each field, one nucleus with an evident nucleolus was randomly chosen for measurement, and the next nine consecutive nuclei were quantified. Out-of-focus and altered-form nuclei were not considered. The background intensity was determined by tracing an unlabeled area adjacent to the measured cells.

The final pixel intensity was calculated by subtracting the values detected in the labeled nuclei from the background (Figure 1).

PTEN Sequencing

Genomic DNA was isolated from CSCC tissue samples according to a proteinase K-based protocol. After DNA isolation, exons 1 through 9 of PTEN were amplified by PCR with primers specific for each region. For the PCR reactions, 2 μ l of DNA at 30 ng/ μ l were mixed with 2.5 μ l of 10X IIB Buffer (40 mMNaCl; 10 mMTrisHCl pH=8.4; 0.1% Triton X-100; 1.5 mM MgCl₂), 2.5 μ l of 0.2 mMdNTPs, 0.5 μ l of each primer at 10 pmol/ μ l and 0,25 μ l of Taq polymerase (0,625 U), for a final volume of 25 μ l. The samples were amplified using an EppendorfMastercycler® (Hamburg, Germany) gradient thermocycler at 94°C for 3 minutes followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds and a final extension time at 72°C for 5 minutes. PCR products were purified using the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) following the manufacturer's protocol and were visualized on a silver-stained 6,5% polyacrylamide gel. Sequences were obtained using an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Bidirectional sequence data were analyzed with Sequencher 4.9 software, and the analysis was followed by a manual review.

Analysis of p53, Ki-67, and CD31 staining

All slides were examined under light microscopy. Staining for p53, Ki-67, and CD31 was evaluated according to the number of positively stained cells by a single pathologist who was blinded to the clinical course of the patient. This was performed by classifying the protein immunoeexpression into four categories for statistical purposes as follows: grade 1, 0% to 25% expression; grade 2, 26% to 50% expression; grade 3, 51% to 75% expression; and grade 4, greater than 75% expression.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with SPSS 18.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The data were analyzed using a chi-square test and Student's t-test to evaluate significant differences between the groups. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Power calculations showed that the sample size ($n=20$) allowed a minimal detectable difference of 35% between the two prevalence rates, with a power of 80% and a type I error of 5%.

4.3. Results

The clinical stage (FIGO) was IB1 in 14 patients (70%) and IB2 in 6 patients (30%). The tumors were well differentiated (G1) in 1 (5%) patient, moderately differentiated (G2) in 15 (75%) patients and poorly differentiated in 4 (20%) patients. Lymphatic vascular invasion was present in 4 patients (20%) (Table 1).

The PTEN expression intensity was lower in the CSCC group than in the benign cervix samples (150.5 ± 5.2 versus 204.2 ± 2.6 ; $p < 0.001$) (Figure 2). No associations were identified between tumor PTEN expression and tumor stage ($p = 0.337$), grade of differentiation ($p = 0.436$), the presence of lymphatic vascular invasion ($p = 0.179$), parametrium involvement ($p = 0.053$) or pelvic lymph node metastasis ($p = 0.859$) in patients with invasive carcinoma of the cervix (study group).

All nine PTEN exons were sequenced, and we were unable to find any modifications in the PTEN exon DNA sequence in the 20 CSCC samples included in the study or in the normal cervical squamous epithelial sample used as control.

PTEN expression was not associated with tumor expression of p53 ($p = 0.969$), CD31 ($p = 0.817$) or Ki-67 ($p = 0.283$) in patients with invasive carcinoma of the cervix (Figure 3).

4.4. Discussion

PTEN genetic alterations occur in multiple types of cancer, such as brain, prostate, breast, thyroid and endometrial. The inactivation of PTEN may play an important role in the pathogenesis of a variety of human malignancies. PTEN protein was significantly diminished in CSCC compared with the control group. These findings suggest that the loss of PTEN expression plays a role in cervical carcinogenesis. Previous reports have also demonstrated that PTEN

expression is progressively reduced along a continuum from normal epithelium to squamous cell carcinoma ^(24, 25).

We have screened the coding regions of PTEN for mutation of the cervix. Our study did not identify any mutations after sequencing all nine PTEN exons, even in the hot spot in exon 5. Structural changes to PTEN in cervical carcinomas do not appear to be common. Previous reports have not identified mutations in the PTEN gene ^(8, 19). However, Poetsch et al. demonstrated PTEN mutations in 23% of head and neck SCC tumor samples ⁽²⁶⁾, and Kurose et al. found intragenic PTEN mutations in 15% (3/20) of cervical tumors ⁽²⁷⁾. PTEN mutations were frequently found in cancers arising from the endometrium ⁽²⁸⁾, brain ⁽²⁹⁾ and prostate ⁽³⁰⁾. An analysis of the PTEN gene in squamous cell carcinomas from other sites also found that PTEN is not frequently mutated in the lung ⁽³¹⁾, cervix ⁽¹⁴⁾, skin ⁽³²⁾, head and neck ⁽³³⁾ or esophagus ⁽³⁴⁾. Although numerous somatic mutations have been localized to the PTEN gene, these only occur in a minority of tumors, which indicates that alternative mechanisms of PTEN inactivation, both genetic and non-genetic, must exist.

We did not study the role of epigenetic changes of PTEN in the development of squamous cell carcinoma. The future challenge is to further understand the roles of epigenetic mechanisms of PTEN alteration and their biological relevance. PTEN inactivation via epigenetic mechanisms was first demonstrated in prostate cancer cell lines ⁽³⁵⁾ and later found in prostate cancer and melanoma ⁽³⁶⁾. The association of poor prognosis with PTEN aberration has also been reported previously in glioma ⁽³⁷⁾ and tongue carcinoma ⁽³⁸⁾. Whether PTEN methylation contributes to the development of cervical cancer and affects

the prognosis has not been elucidated. Cheng et al found that PTEN methylation was significantly associated with reduced total and disease-free survival and suggested that tumors without normal PTEN functioning may be more aggressive ⁽⁸⁾.

In the present work, we analyzed p53, CD31 and Ki-67 expression and their association with PTEN expression in CSCC. We believe that our study is the first report describing PTEN expression in a benign cervix and cervical cancer lines and the association between expression and those biomarkers. The roles of p53 and PTEN in cervical carcinogenesis have been addressed, but little is known about the interaction of these proteins in cervical cancer. PTEN has been shown to directly associate with p53, increasing its stability, protein levels, and transcriptional activity ⁽³⁹⁾. The expression of Ki-67 and CD31 was assessed in various grades of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) to evaluate their potential for predicting the extent of possible damage to the epithelium and CIN progression. Proliferating cells express a nonhistone protein with a short half-life in their nuclei, known as Ki-67. Cell proliferation has been described as an additional parameter that is useful in the prognostic evaluation of cervical cancer. To evaluate intratumoral vascularization, blood microvessels are usually immunostained with a panendothelial marker, such as factor VIII-related antigen, CD31 or CD34. No significant association was found between PTEN and other biomarkers, suggesting that the loss of PTEN expression is sufficient to facilitate tumorigenesis, but different mechanisms may explain cervical carcinogenesis.

Our study did not identify any clinical or pathologic factors associated with PTEN expression in CSCC specimens. Given the limited number of samples that we investigated, our ability to detect prognostic associations of modest size was limited. The association between PTEN expression and disease outcome warrants further investigation in a larger study cohort along with an analysis of PTEN expression and prognostic factors.

In conclusion, our findings demonstrate that the PTEN protein is significantly diminished in CSCC. Therefore, we argue that PTEN plays an important role in carcinogenesis in the uterine cervix.

It is interesting to note that no mutations in PTEN are apparent. Alternative mechanisms of PTEN dysregulation, such as epigenetic mechanisms, that result in clinical manifestations must therefore exist. Additional functions will certainly be uncovered and these should help us to further elucidate the importance of this protein in human health and disease.

4.5. Tables and Figures Legends

Variables	PTEN (mean± SEM)	p
Clinicalstage		0.337
IB1	150.8 ± 6.4	
IB2	159 ± 4.9	
Tumor grade		0.436
G1 and G2	150.5 ± 15.9	
G3	159.2 ± 7.7	
LVSI		0.179
No	150.2 ± 14.8	
Yes	163.2 ± 11.1	
Parametrial		0.053
Invasion		
No	147.6 ± 13.6	
Yes	164.4 ± 10.5	
Lymph Node		0.859
Metastasis		
Yes	152.7 ± 13.2	
No	154.3 ± 16.5	

Table 1: Association of tumor size, grade of differentiation, presence of lymphatic vascular invasion, parametrium involvement and pelvic lymph node metastasis with tumor PTEN expression in patients with squamous cell carcinoma of the cervix.

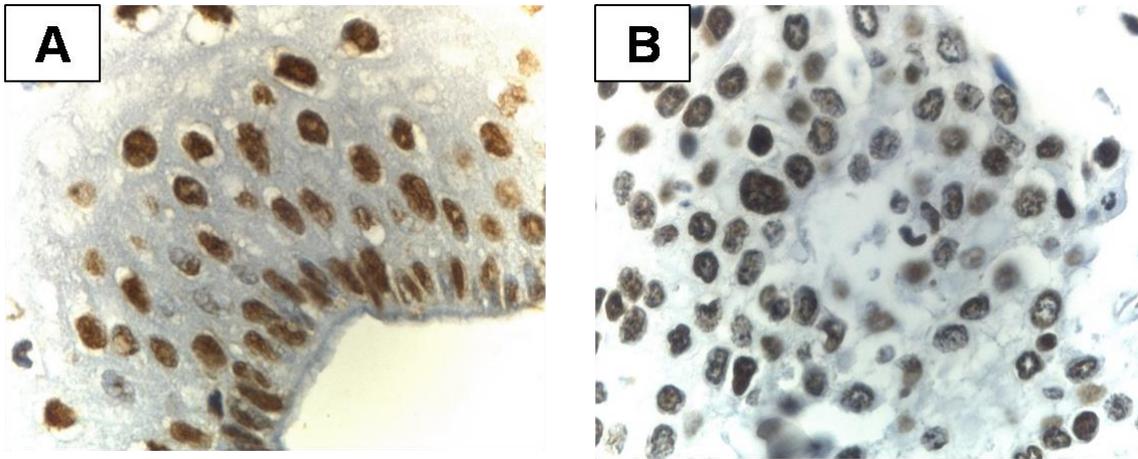


Figure 1: Photomicrographs of a squamous cell carcinoma with PTEN nuclear immunostaining in normal cervical epithelium (A) and cervical CSCC (B). The markup is brown. Note the reduction in intensity of expression in the CSCC as compared to control. 400X magnification.

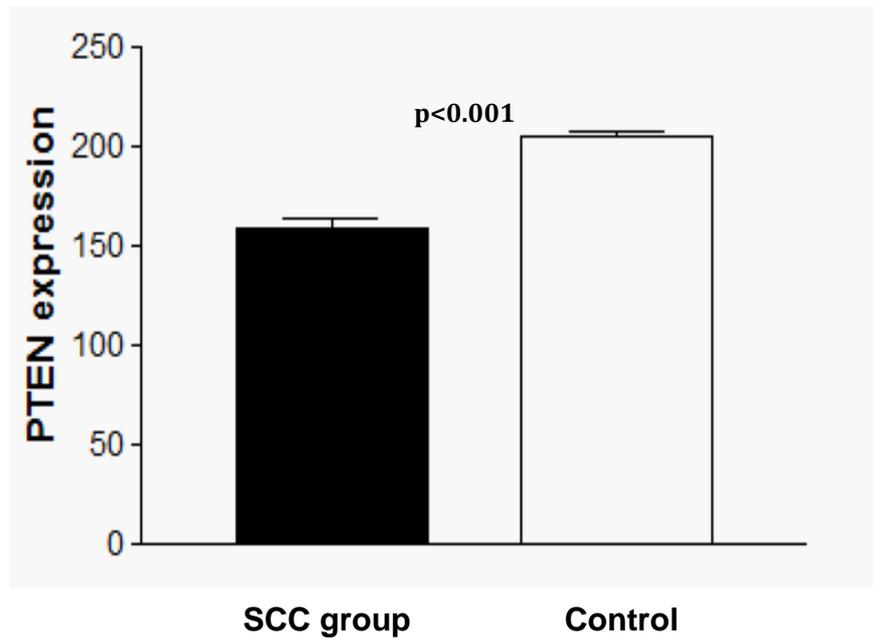
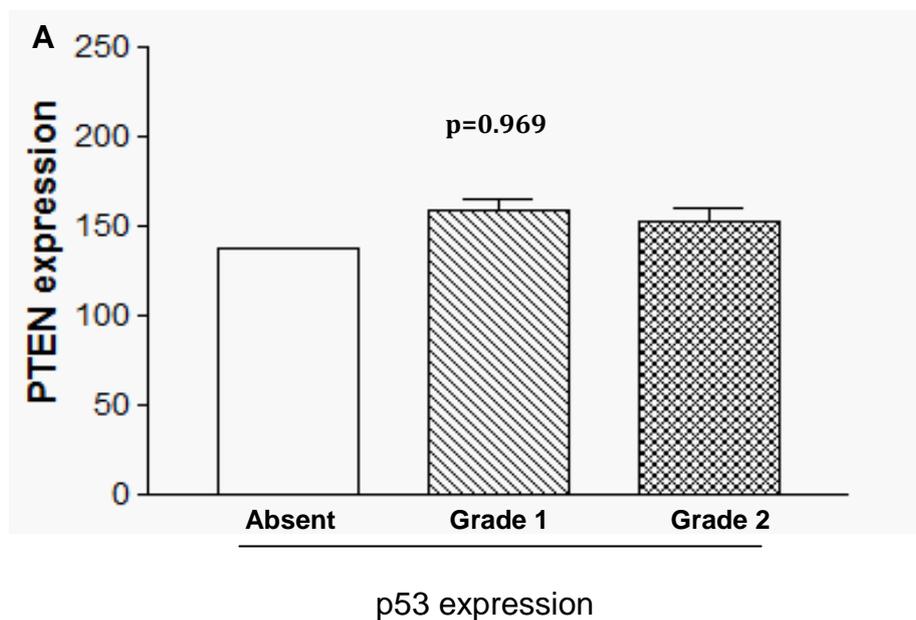


Figure 2: Expression of PTEN intensity in benign cervix (control group) and in the tumor (study group). Note: Differences between groups were assessed by t student test (two groups).



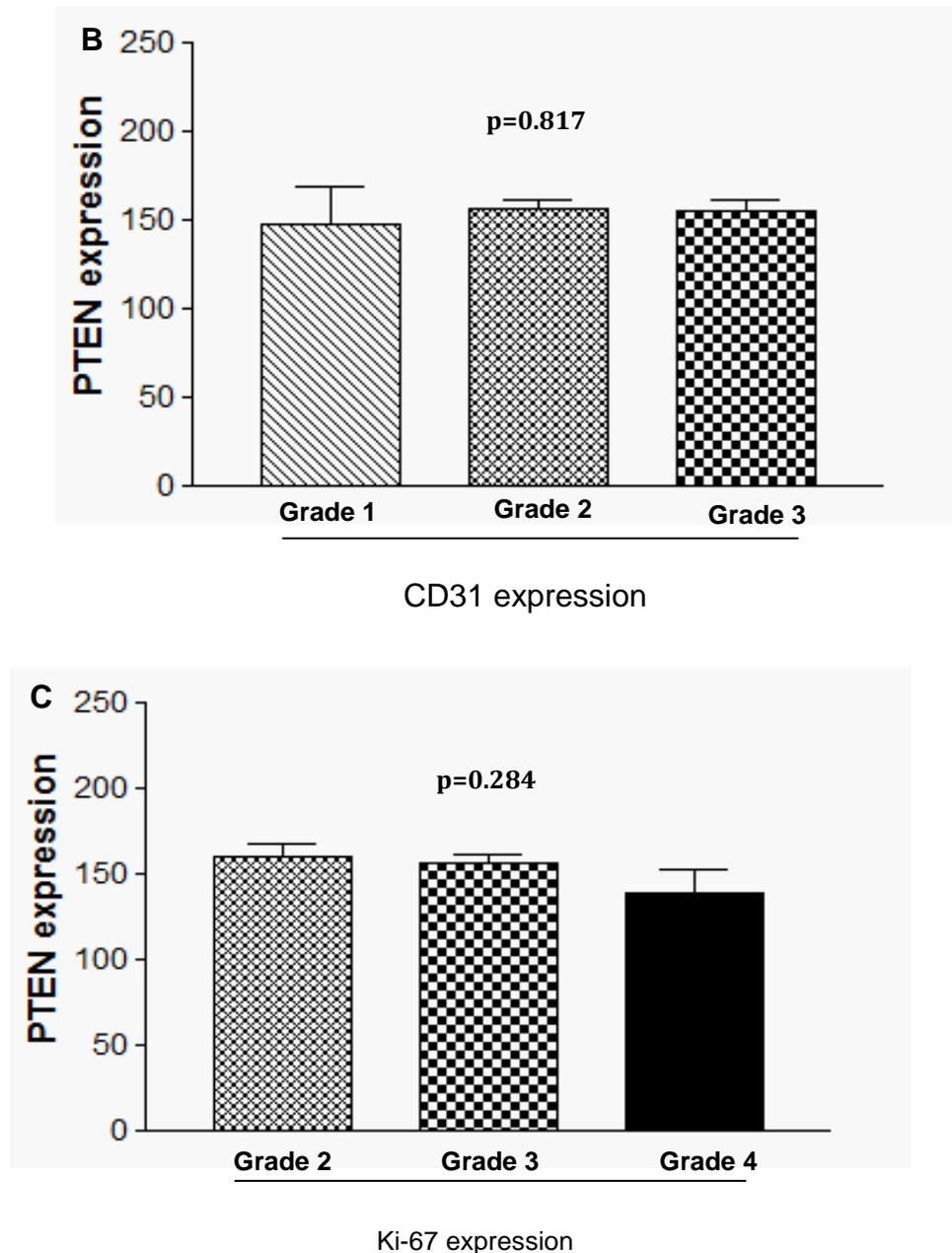


Figure 3: Association between PTEN expression and p53 (A), CD31(B) and Ki-67 (C) tumor expression in patients with squamous cell carcinoma of the cervix.

Note: Differences between groups were assessed by the t student test (two groups). Grade 1: less than 25% expression; Grade 2: 26% to 50% expression; Grade 3: 51% to 75% expression; Grade 4: greater than 75% expression.

4.6. References

1. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. <http://www-dep.iarc.fr/2008> [cited May 15 2012].
2. Waggoner SE. Cervical cancer. *Lancet*. 2003;361(9376):2217-25.
3. (INCA) INdC. Estimativa 2012. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/2012> [cited 2012 May 15 2012].
4. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2008;110(3 Suppl 2):S4-7.
5. Giarnieri E, Zanesi N, Bottoni A, Alderisio M, Lukic A, Vecchione A, et al. Oncosuppressor proteins of fragile sites are reduced in cervical cancer. *Cancer Lett*. 2010;289(1):40-5.
6. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
7. Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med*. 2002;347(20):1593-603.
8. Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Chan LK, Heung MS, Chan CS, et al. Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasm. *Gynecol Oncol*. 2004;93(3):621-7.
9. Tamguney T, Stokoe D. New insights into PTEN. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 23):4071-9.
10. Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol*. 2000;20(14):5010-8.

11. Alvarez-Nuñez F, Bussaglia E, Mauricio D, Ybarra J, Vilar M, Lerma E, et al. PTEN promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas. *Thyroid*. 2006;16(1):17-23.
12. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997;275(5308):1943-7.
13. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JP, Lees JA, et al. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(11):924-30.
14. Tashiro H, Blazes MS, Wu R, Cho KR, Bose S, Wang SI, et al. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res*. 1997;57(18):3935-40.
15. Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol*. 2004;22(14):2954-63.
16. Gasparotto D, Vukosavljevic T, Piccinin S, Barzan L, Sulfaro S, Armellin M, et al. Loss of heterozygosity at 10q in tumors of the upper respiratory tract is associated with poor prognosis. *Int J Cancer*. 1999;84(4):432-6.
17. Harima Y, Sawada S, Nagata K, Sougawa M, Ostapenko V, Ohnishi T. Mutation of the PTEN gene in advanced cervical cancer correlated with tumor progression and poor outcome after radiotherapy. *Int J Oncol*. 2001;18(3):493-7.
18. Henderson YC, Wang E, Clayman GL. Genotypic analysis of tumor suppressor genes PTEN/MMAC1 and p53 in head and neck squamous cell carcinomas. *Laryngoscope*. 1998;108(10):1553-6.

19. Su TH, Chang JG, Perng LI, Chang CP, Wei HJ, Wang NM, et al. Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2000;76(2):193-9.
20. Vázquez-Ulloa E, Lizano M, Avilés-Salas A, Alfaro-Moreno E, Contreras-Paredes A. Abnormal distribution of hDlg and PTEN in premalignant lesions and invasive cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2011;122(3):663-8.
21. Benedet JL, Bender H, Jones H, Ngan HY, Pecorelli S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet.* 2000;70(2):209-62.
22. Shepherd JH. Cervical and vulva cancer: changes in FIGO definitions of staging. *Br J Obstet Gynaecol.* 1996;103(5):405-6.
23. Kamura T, Shigematsu T, Kaku T, Shimamoto T, Saito T, Sakai K, et al. Histopathological factors influencing pelvic lymph node metastases in two or more sites in patients with cervical carcinoma undergoing radical hysterectomy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1999;78(5):452-7.
24. Lee JS, Choi YD, Lee JH, Nam JH, Choi C, Lee MC, et al. Expression of PTEN in the progression of cervical neoplasia and its relation to tumor behavior and angiogenesis in invasive squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol.* 2006;93(3):233-40.
25. Qi M, Anderson AE, Chen DZ, Sun S, Auburn KJ. Indole-3-carbinol prevents PTEN loss in cervical cancer in vivo. *Mol Med.* 2005;11(1-12):59-63.
26. Poetsch M, Lorenz G, Kleist B. Detection of new PTEN/MMAC1 mutations in head and neck squamous cell carcinomas with loss of chromosome 10. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002;132(1):20-4.

27. Kurose K, Zhou XP, Araki T, Eng C. Biallelic inactivating mutations and an occult germline mutation of PTEN in primary cervical carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000;29(2):166-72.
28. Kong D, Suzuki A, Zou TT, Sakurada A, Kemp LW, Wakatsuki S, et al. PTEN1 is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. *Nat Genet*. 1997;17(2):143-4.
29. Boström J, Cobbers JM, Wolter M, Tabatabai G, Weber RG, Lichter P, et al. Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q. *Cancer Res*. 1998;58(1):29-33.
30. Feilotter HE, Nagai MA, Boag AH, Eng C, Mulligan LM. Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas. *Oncogene*. 1998;16(13):1743-8.
31. Petersen S, Rudolf J, Bockmühl U, Gellert K, Wolf G, Dietel M, et al. Distinct regions of allelic imbalance on chromosome 10q22-q26 in squamous cell carcinomas of the lung. *Oncogene*. 1998;17(4):449-54.
32. Kubo Y, Urano Y, Hida Y, Arase S. Lack of somatic mutation in the PTEN gene in squamous cell carcinomas of human skin. *J Dermatol Sci*. 1999;19(3):199-201.
33. Okami K, Wu L, Riggins G, Cairns P, Goggins M, Evron E, et al. Analysis of PTEN/MMAC1 alterations in aerodigestive tract tumors. *Cancer Res*. 1998;58(3):509-11.
34. Hu YC, Lam KY, Tang JC, Srivastava G. Mutational analysis of the PTEN/MMAC1 gene in primary oesophageal squamous cell carcinomas. *Mol Pathol*. 1999;52(6):353-6.

35. Wang L, Wang WL, Zhang Y, Guo SP, Zhang J, Li QL. Epigenetic and genetic alterations of PTEN in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2007;37(5):389-96.
36. Zhou XP, Gimm O, Hampel H, Niemann T, Walker MJ, Eng C. Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation. *Am J Pathol.* 2000;157(4):1123-8.
37. Lin H, Bondy ML, Langford LA, Hess KR, Delclos GL, Wu X, et al. Allelic deletion analyses of MMAC/PTEN and DMBT1 loci in gliomas: relationship to prognostic significance. *Clin Cancer Res.* 1998;4(10):2447-54.
38. Lee JI, Soria JC, Hassan KA, El-Naggar AK, Tang X, Liu DD, et al. Loss of PTEN expression as a prognostic marker for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001;127(12):1441-5.
39. Freeman DJ, Li AG, Wei G, Li HH, Kertesz N, Lesche R, et al. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell.* 2003;3(2):117-30.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A participação do gene PTEN na carcinogênese do colo do útero é controversa. Apesar da mutação do gene não ser encontrada em diversos estudos em carcinoma de células do colo ⁽⁴³⁾ e pele ⁽⁵⁸⁾, outros estudos indicam mecanismos alternativos, genéticos ou epigenéticos, de inativação do gene.

Nosso estudo permitiu identificar diferenças na expressão do PTEN entre os grupos avaliados. Apesar de não ter encontrado mutações de DNA, encontramos significativa redução da expressão do PTEN nas amostras de CCE em comparação ao tecido normal.

Não houve associação entre a redução na expressão do PTEN e fatores prognósticos anátomo-clínicos, o p53 e os marcadores de angiogênese e proliferação celular. A limitação do número de pacientes estudadas pode ter influenciado esses resultados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6.Referências Bibliográficas

1. (IARC) IAfRaC. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. <http://www-dep.iarc.fr/2008> [cited 2012 May 15 2012].
2. (INCA) INdC. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/2012> [cited 2012 May 15 2012].
3. Spriggs AI, Boddington MM. Progression and regression of cervical lesions. Review of smears from women followed without initial biopsy or treatment. *J Clin Pathol.* 1980;33(6):517-22.
4. Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol.* 2002;3(1):11-6.
5. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008;110(3 Suppl 2):S4-7.
6. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(2):74-108.
7. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angström T, Lindström MS, Wallin KL. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(7):2407-14.
8. Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Meijer CJ. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol.* 2006;208(2):152-64.
9. Del Mare S, Salah Z, Aqeilan RI. WWOX: its genomics, partners, and functions. *J Cell Biochem.* 2009;108(4):737-45.

10. Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol.* 2000;20(14):5010-8.
11. Dimitrakakis C, Kymionis G, Diakomanolis E, Papaspyrou I, Rodolakis A, Arzimanoglou I, et al. The possible role of p53 and bcl-2 expression in cervical carcinomas and their premalignant lesions. *Gynecol Oncol.* 2000;77(1):129-36.
12. Hall PA, Lane DP. p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry?--Revisited! *J Pathol.* 1994;172(1):1-4.
13. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000;408(6810):307-10.
14. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 4ª edição ed2002.
15. Grace VM, Shalini JV, Iekha TT, Devaraj SN, Devaraj H. Co-overexpression of p53 and bcl-2 proteins in HPV-induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 2003;91(1):51-8.
16. Silva-Filho AL, Traiman P, Triginelli SA, Reis FM, Pedrosa MS, Miranda D, et al. Expression of p53, Ki-67, and CD31 in the vaginal margins of radical hysterectomy in patients with stage IB carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol.* 2004;95(3):646-54.
17. Kainz C, Kohlberger P, Gitsch G, Sliutz G, Breiteneker G, Reinthaller A. Mutant p53 in patients with invasive cervical cancer stages IB to IIB. *Gynecol Oncol.* 1995;57(2):212-4.
18. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.

19. Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med.* 2002;347(20):1593-603.
20. Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, Goteri G, De Nictolis M, Biagini G. MIB 1 immunostaining in cervical carcinoma of young patients. *Gynecol Oncol.* 1997;67(2):184-7.
21. Viberti L, Papotti M, Abbona GC, Celano A, Filosso PL, Bussolati G. Value of Ki-67 immunostaining in preoperative biopsies of carcinomas of the lung. *Hum Pathol.* 1997;28(2):189-92.
22. Jansen MP, Machiels BM, Hopman AH, Broers JL, Bot FJ, Arends JW, et al. Comparison of A and B-type lamin expression in reactive lymph nodes and nodular sclerosing Hodgkin's disease. *Histopathology.* 1997;31(4):304-12.
23. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(7):884-91.
24. Klimek M, Kruczak A, Ryś J, Mularz K, Halaszka K, Przewoźnik M, et al. Clinico-morphological parameters affecting survival of patients with advanced cervical cancer. *Pol J Pathol.* 2011;62(4):250-6.
25. Ho DM, Hsu CY, Chiang H. MIB-1 labeling index as a prognostic indicator for survival in patients with FIGO stage IB squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol.* 2000;76(1):97-102.
26. Abulafia O, Triest WE, Sherer DM. Angiogenesis in malignancies of the female genital tract. *Gynecol Oncol.* 1999;72(2):220-31.

27. Sauer G, Deissler H. Angiogenesis: prognostic and therapeutic implications in gynecologic and breast malignancies. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2003;15(1):45-9.
28. Randall LM, Monk BJ, Darcy KM, Tian C, Burger RA, Liao SY, et al. Markers of angiogenesis in high-risk, early-stage cervical cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol.* 2009;112(3):583-9.
29. Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Chan LK, Heung MS, Chan CS, et al. Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasm. *Gynecol Oncol.* 2004;93(3):621-7.
30. Tamguney T, Stokoe D. New insights into PTEN. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 23):4071-9.
31. Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol.* 2004;22(14):2954-63.
32. Leever SJ, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11(2):219-25.
33. Leslie NR, Downes CP. PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem J.* 2004;382(Pt 1):1-11.
34. Planchon SM, Waite KA, Eng C. The nuclear affairs of PTEN. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 3):249-53.
35. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets.* 2008;8(3):187-98.
36. Freeman DJ, Li AG, Wei G, Li HH, Kertesz N, Lesche R, et al. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through

phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell*. 2003;3(2):117-30.

37. Henderson YC, Wang E, Clayman GL. Genotypic analysis of tumor suppressor genes PTEN/MMAC1 and p53 in head and neck squamous cell carcinomas. *Laryngoscope*. 1998;108(10):1553-6.

38. Rasheed BK, Stenzel TT, McLendon RE, Parsons R, Friedman AH, Friedman HS, et al. PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res*. 1997;57(19):4187-90.

39. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997;275(5308):1943-7.

40. Alvarez-Nuñez F, Bussaglia E, Mauricio D, Ybarra J, Vilar M, Lerma E, et al. PTEN promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas. *Thyroid*. 2006;16(1):17-23.

41. Kong D, Suzuki A, Zou TT, Sakurada A, Kemp LW, Wakatsuki S, et al. PTEN1 is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. *Nat Genet*. 1997;17(2):143-4.

42. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JP, Lees JA, et al. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(11):924-30.

43. Tashiro H, Blazes MS, Wu R, Cho KR, Bose S, Wang SI, et al. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res*. 1997;57(18):3935-40.

44. Rizvi MM, Alam MS, Ali A, Mehdi SJ, Batra S, Mandal AK. Aberrant promoter methylation and inactivation of PTEN gene in cervical carcinoma from Indian population. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011;137(8):1255-62.
45. Harima Y, Sawada S, Nagata K, Sougawa M, Ostapenko V, Ohnishi T. Mutation of the PTEN gene in advanced cervical cancer correlated with tumor progression and poor outcome after radiotherapy. *Int J Oncol*. 2001;18(3):493-7.
46. Kurose K, Zhou XP, Araki T, Eng C. Biallelic inactivating mutations and an occult germline mutation of PTEN in primary cervical carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000;29(2):166-72.
47. Gasparotto D, Vukosavljevic T, Piccinin S, Barzan L, Sulfaro S, Armellin M, et al. Loss of heterozygosity at 10q in tumors of the upper respiratory tract is associated with poor prognosis. *Int J Cancer*. 1999;84(4):432-6.
48. Su TH, Chang JG, Perng LI, Chang CP, Wei HJ, Wang NM, et al. Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2000;76(2):193-9.
49. Shao X, Tandon R, Samara G, Kanki H, Yano H, Close LG, et al. Mutational analysis of the PTEN gene in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1998;77(5):684-8.
50. Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ*. 2006;174(3):341-8.
51. Ducasse M, Brown MA. Epigenetic aberrations and cancer. *Mol Cancer*. 2006;5:60.
52. Szyf M. The dynamic epigenome and its implications in toxicology. *Toxicol Sci*. 2007;100(1):7-23.

53. Shepherd JH. Cervical and vulva cancer: changes in FIGO definitions of staging. *Br J Obstet Gynaecol.* 1996;103(5):405-6.
54. Benedet JL, Bender H, Jones H, Ngan HY, Pecorelli S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet.* 2000;70(2):209-62.
55. Piver MS, Rutledge F, Smith JP. Five classes of extended hysterectomy for women with cervical cancer. *Obstet Gynecol.* 1974;44(2):265-72.
56. HEANEY NS. Additional data in the technic of vaginal hysterectomy. *West J Surg Obstet Gynecol.* 1948;56(7):377-85.
57. Kamura T, Shigematsu T, Kaku T, Shimamoto T, Saito T, Sakai K, et al. Histopathological factors influencing pelvic lymph node metastases in two or more sites in patients with cervical carcinoma undergoing radical hysterectomy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1999;78(5):452-7.
58. Kubo Y, Urano Y, Hida Y, Arase S. Lack of somatic mutation in the PTEN gene in squamous cell carcinomas of human skin. *J Dermatol Sci.* 1999;19(3):199-201.

7. ANEXOS

7.1 ANEXO I: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

IDENTIFICAÇÃO DA PACIENTE:

Nome:

Registro:

Idade:

Endereço:

Telefone:

Carteira de identidade:

A senhora está sendo convidada a participar de um projeto de pesquisa que visa investigar a presença de algumas substâncias no colo uterino que possam nos ajudar a fazer o diagnóstico das doenças desse órgão.

A participação no estudo consiste em doar uma parte do material, que foi retirado durante a sua cirurgia para tratamento de câncer do colo uterino ou mioma, para serem analisados. Essa participação não modifica o tratamento proposto para a sua doença ou o seu acompanhamento médico.

A sua identidade será preservada e o seu direito de não participar no estudo não a prejudicará no seu tratamento.

1. DESCRIÇÃO DAS COMPLICAÇÕES DOS MÉTODOS: não haverá aumento do risco de complicações do seu tratamento. As complicações serão as mesmas relacionadas ao procedimento cirúrgico realizado previamente (retirado do útero).

2. Recebi todas as informações que desejava conhecer e a possibilidade de fazer perguntas e questionar dúvidas.

3. Também entendi que, a qualquer momento e sem necessidade de dar nenhuma explicação poderei suspender o consentimento que agora presto.

Investigador: Prof. Agnaldo L. Silva Filho

Endereço: Avenida Professor Alfredo Balena 110/4^oandar. Santa Efigênia. Belo Horizonte. Minas Gerais. CEP: 30 130 100. Tel: (31) 32489764 / 92250909

De pleno acordo

Cidade:

Data:

Assinatura do médico

Assinatura da paciente

Testemunha

Testemunha

Declaro que é possível a qualquer momento antes da cirurgia revogar o meu consentimento.

Revogo o consentimento prestado no dia E afirmo que não desejo prosseguir na pesquisa e tratamento que me foi proposto, que dou como finalizado nesta data.

Cidade:

Data:

Assinatura do médico

Assinatura da paciente

Testemunha

Testemunha

7.2 ANEXO II: ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE COLO UTERINO (FIGO)

Estádio I	O carcinoma está restrito ao colo do útero
Ia	câncer invasor identificado apenas microscopicamente. A invasão é limitada ao estroma com uma profundidade máxima de 5mm e diâmetro inferior a 7mm.
Ia1	invasão do estroma inferior a 3mm em profundidade e inferior a 7mm em diâmetro
Ia2	invasão do estroma superior a 3mm e inferior a 5mm em profundidade, diâmetro inferior a 7mm.
Ib	lesões clínicas confinadas ao colo ou lesões pré-clínicas maiores que o estágio IA
Ib1	lesões clínicas menores que 4 cm
Ib2	lesões clínicas maiores que 4 cm
Estádio II	O carcinoma ultrapassa o colo, mas não se estende à parede pélvica. O tumor envolve a vagina, não o 1/3 inferior.
Ila	sem óbvio acometimento parametrial. Envolve os 2/3 superiores da vagina.
Ilb	acometimento parametrial óbvio, não a parede pélvica.
Estádio III	O carcinoma se estende à parede pélvica. No toque retal não se evidencia espaço livre de neoplasia entre o tumor e a parede lateral da pelve. O 1/3 inferior da vagina é acometido. Todos os casos com hidronefrose ou insuficiência renal devem ser incluídos, exceto se atribuídas a outras causas.
IIla	tumor envolve o 1/3 inferior da vagina, sem extensão à parede

pélvica

IIIb tumor se estende à parede pélvica e/ou causa hidronefrose ou insuficiência renal

Estádio IV O tumor invade a mucosa da bexiga ou reto e/ou ultrapassa a pelve verdadeira.

IVa disseminação tumoral aos órgãos pélvicos adjacentes

IVb disseminação tumoral à distância

7.2 ANEXO III: DESCRIÇÃO DA TÉCNICA CIRÚRGICA

1. Laparotomia mediana infra e supraumbilical, com avaliação das estruturas abdominais e pélvicas.
2. Ligaduras dos ligamentos redondos e infundíbulo – pélvicos; aberta lateral do peritônio parietal com dissecação do espaço paravesical e pararretal e identificação dos ligamentos cardinal e úterossacos.
3. Identificação do ureter no espaço retroperitoneal e, em seguida, dissecação do túnel do ureter, com ligadura do ligamento vesicouterino e do pilar vesical. Liberação do ureter até a sua penetração na musculatura vesical.
4. Abertura do septo retovaginal, com separação do reto da porção proximal da vagina anteriormente e dos ligamentos uterossacos lateralmente.
5. Ligadura do ligamento cardinal no seu terço lateral, próximo a parede pélvica.
6. Ligadura dos paracolpos, com abertura da cavidade vaginal, com retirada o terço superior da vagina, útero e anexos em monobloco.
7. Fechamento da vagina.
8. Linfadenectomia pélvica, iniciando a dissecação pela cadeia linfonodal dos vasos ilíacos comuns; em seguida dos vasos ilíacos externos, internos e fossas obturatórias.
9. Síntese da parede abdominal por planos.



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
epg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **LUCIANO FERNANDES LOURES**, nº de registro 201011659749. No dia vinte de julho de dois mil e doze, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“EXPRESSÃO DO GENE PTEN: AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA, SEQÜENCIAMENTO GENÉTICO E ASSOCIAÇÃO COM p53, Ki-67 E CD 31 EM PACIENTE COM CARCINOMA DE COLO DE ÚTERO”**, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Patologia Ginecológica e Reprodução. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Agnaldo Lopes da Silva Filho, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Agnaldo Lopes da Silva Filho /Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADO</u>
Profª. Paula Vieira Teixeira Vidigal/Coorientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADO</u>
Prof. Eduardo Batista Cândido	Instituição: UFSJ	Indicação: <u>APROVADO</u>
Prof. João Carlos Arantes Junior	Instituição: UFJF	Indicação: <u>APROVADO</u>

Pelas indicações o candidato foi considerada APROVADO.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 20 de julho de 2012.

Prof. Agnaldo Lopes da Silva Filho /Orientador Agnaldo Lopes da Silva Filho

Profª. Paula Vieira Teixeira Vidigal Paula Vidigal

Prof. Eduardo Batista Cândido Eduardo B. Cândido

Prof. João Carlos Arantes Junior João Carlos Arantes Junior

Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral/Coordenador Antônio Carlos Vieira Cabral

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Saúde da Mulher
Faculdade de Medicina - UFMG



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640
cpg@medicina.ufmg.br



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores Agnaldo Lopes da Silva Filho, Paula Vieira Teixeira Vidigal, Eduardo Batista Cândido e João Carlos Arantes Junior, aprovou a defesa da dissertação intitulada "EXPRESSÃO DO GENE PTEN: AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA, SEQÜENCIAMENTO GENÉTICO E ASSOCIAÇÃO COM p53, Ki-67 E CD 31 EM PACIENTE COM CARCINOMA DE COLO DE ÚTERO" apresentada pelo mestrando LUCIANO FERNANDES LOURES para obtenção do título de mestre em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de concentração em Patologia Ginecológica e Reprodução da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 20 de julho de 2012.

Prof. Agnaldo Lopes da Silva Filho
Orientador

Prof. Paula Vieira Teixeira Vidigal
Coorientadora

Prof. Eduardo Batista Cândido

Prof. João Carlos Arantes Junior