

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

IDENTIFICAÇÃO DE DNA-HPV TIPOS 16 e 18 E DA
EXPRESSÃO DE p16INK4 EM ADENOCARCINOMAS DE
COLO UTERINO

CARLA FLORES BRAGA

CAXIAS DO SUL, 2007

CARLA FLORES BRAGA

**IDENTIFICAÇÃO DE DNA-HPV TIPOS 16 e 18 E DA
EXPRESSÃO DE p16INK4 EM ADENOCARCINOMAS DE
COLO UTERINO**

Projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de mestre em biotecnologia.

Orientador:

Prof. Dr. Eduardo Pretto Serafini

Co-orientadora:

Profa. Dra. Jovana Mandelli

CAXIAS DO SUL, 2007

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Eduardo Pretto Serafini por ter me acolhido no seu laboratório e pela oportunidade de me permitir partilhar de seu conhecimento na área.

À co-orientadora Profa. Dra. Jovana Mandelli pelo criterioso trabalho desenvolvido para que esta pesquisa obtivesse resultados de qualidade.

À banca examinadora composta pelo Prof. Dr. Fábio Pasqualotto e pelo Prof. Dr. Celso Piccoli Coelho, os quais me auxiliaram desde os pequenos detalhes até as questões de maior amplitude.

Às colegas do Laboratório de Patologia da UCS, Nilza Losquiavo, Silvana Endres e, em especial, à Kamille Losquiavo pelo grande auxílio no desenvolvimento da técnica da pesquisa.

À colega Alessandra Eifler Guerra Godoi pela idéia inicial do trabalho e pelo grande auxílio nas etapas seguintes, desde a seleção das amostras até as críticas e sugestões.

Às minhas queridas colegas de turma, Tamy Umezu Cezar e Letícia Lucchese pelo apoio e companheirismo ao longo destes dois anos.

Ao Prof. Dr. Mário Wagner pela consultoria na análise estatística dos resultados.

Aos mestres que compõem o Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

Às funcionárias dos Laboratórios Diagnose (de Bento Gonçalves e Caxias do Sul) e do Laboratório de Patologia do Hospital Geral pelo auxílio na captação das amostras.

Aos meus colegas de trabalho pela ajuda em trocas de plantões para a realização do mestrado.

E, por fim, um agradecimento especial a minha família pelo constante apoio.

ÍNDICE

RESUMO	10
ABSTRACT	11
PALAVRAS-CHAVE	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 ADENOCARCINOMA DE COLO UTERINO	15
3.1.1 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA O ADENOCARCINOMA	18
3.1.1.1 CITOPATOLOGIA	18
3.1.1.2 HISTOPATOLOGIA	19
3.1.1.3 COLPOSCOPIA	20
3.2 O VÍRUS	21
3.2.1 GENOMA VIRAL E ONCOGENES	23
3.2.2 A EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR HPV	26
3.2.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA O HPV	28
3.2.3.1 CITOPATOLOGIA E HISTOPATOLOGIA	28
3.2.3.2 MÉTODOS MOLECULARES	28
3.3 A PROTEÍNA P16INK4	29
3.3.1 A PROTEÍNA P16INK4 COMO MARCADOR TUMORAL	33
3.3.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA	34
4. OBJETIVOS	36
4.1 OBJETIVO GERAL	36
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5. MATERIAIS E MÉTODOS	37
5.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA	37
5.2 EXAME HISTOPATOLÓGICO	38
5.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA	38
5.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA P16INK4	40

5.5 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE DNA-HPV	43
5.5.1 EXTRAÇÃO DE DNA	43
5.5.2 REALIZAÇÃO DA NESTED-PCR PARA HPV 16 E 18	43
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6.1 RESULTADOS DESCRITIVOS DA AMOSTRA	47
6.2 RESULTADO DA HISTOPATOLOGIA	48
6.3 RESULTADOS ENCONTRADOS NO NESTED-PCR PARA DNA-HPV TIPOS 16 E 18	51
6.4 RESULTADO DA IDENTIFICAÇÃO DO TIPO DE HPV (16 OU 18) ENVOLVIDO	55
6.5 RESULTADO DA IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA P16INK4	57
6.5.1 MÉTODO BINÁRIO	58
6.5.2 INTENSIDADE DA COLORAÇÃO (MÉTODO POR SCORE)	61
6.5.3 PORCENTAGEM DE CÉLULAS CORADAS	64
6.5.4 PADRÃO DE COLORAÇÃO	66
7. CONCLUSÕES	70
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	71
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
10. ANEXOS	83
10.1 ANEXO 1: DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E TERMO DE COMPROMISSO DE CONFIDENCIALIDADE	83
10.2 ANEXO 2: PROTOCOLO PARA ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO INDIVIDUAL DA AMOSTRA	85
10.3 TABELA DE DADOS	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos tipos de HPV por oncogenicidade cervical.	22
Tabela 2: Prevalência de DNA-HPV tipo-específico entre mulheres infectadas por HPV.	27
Tabela 3: Positividade de DNA-HPV relacionada à presença ou ausência de invasão.	34
Tabela 4: Percentuais encontrados para os tipos de HPV nas lesões.	55
Tabela 5: Expressão da p16INK4 por IHQ relacionada ao diagnóstico histopatológico utilizando-se o método binário.	59
Tabela 6: Correlação entre os tipos de HPV e a presença da proteína p16INK4.	60
Tabela 7: Correlação entre a presença do DNA-HPV e a intensidade de coloração.	63
Tabela 8: Correlação entre a presença do DNA-HPV e o percentual de coloração para p16INK4.	64
Tabela 9: Correlação entre a presença de DNA-HPV e o padrão de coloração para a proteína p16INK4.	67

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Peça cirúrgica com adenocarcinoma de colo uterino invasor.	16
Fig. 2: Adenocarcinoma endocervical in situ.	17
Fig. 3: Citopatológico de adenocarcinoma bem diferenciado da endocérvice.	19
Fig. 4: Corte histológico de adenocarcinoma endocervical invasor.	20
Fig. 5: Representação esquemática do genoma do HPV-16.	24
Fig. 6. Desenho esquemático mostrando o ciclo celular e algumas proteínas reguladoras.	31
Fig. 7: Representação esquemática mostrando o papel da proteína p16 na carcinogênese.	32
Fig. 8: Fluxograma ilustrando a condução do experimento.	37
Fig. 9: Aplicação do anticorpo primário e do polímero enzimático.	39
Fig. 10: Fotomicrografia realizada por meio de microscópio óptico com aumento de 40X ilustrando a coloração típica da expressão da p16INK4 evidenciada por IHQ.	40
Fig. 11: Métodos de graduação utilizados para a análise da coloração para p16INK4.	41
Fig. 12: Fotomicrografia em grande aumento impressa e dividida em quatro quadrantes para realização do método percentual de positividade para a p16INK4.	42
Fig. 13: Gel de poliacrilamida com as bandas de 132 pb das amostras HPV 16 positivas.	45
Fig. 14: Gel de poliacrilamida com as bandas de 123 pb das amostras positivas para HPV 18.	46

Fig. 15: Distribuição das amostras conforme a presença ou ausência do gene da β -globina.	47
Fig. 16: Distribuição das amostras conforme a presença ou ausência de invasão.	49
Fig. 17: Corte histológico de um adenocarcinoma de colo uterino invasor visto em microscopia óptica com aumento de 100 X.	49
Fig. 18: Corte histológico de um adenocarcinoma de colo uterino <i>in situ</i> visto em microscopia óptica com aumento de 100 X.	50
Fig. 19: Distribuição da presença de DNA-HPV 16 e 18 por Nested-PCR .	53
Fig. 20: Representação gráfica da distribuição da presença de DNA-HPV 16 e 18 nas lesões.	57
Fig. 21. Distribuição dos casos positivos e negativos para p16INK4.	58
Fig. 22: Distribuição da intensidade de coloração (método de escore) entre as amostras.	61
Fig. 23: Microscopia óptica de três cortes histológicos demonstrando a graduação de positividade da p16INK4 por escore (1+, 2+ e 3+), respectivamente.	63
Fig. 24: Distribuição das amostras com HPV conforme a IHQ para p16INK4 pelo método de percentual de coloração.	65
Fig. 25: Distribuição das amostras sem HPV conforme a IHQ para p16INK4 pelo método de percentual de coloração.	65
Fig. 26. Distribuição das amostras HPV positivo conforme o padrão de coloração	68
Fig. 27. Distribuição das amostras HPV negativo conforme o padrão de coloração	68

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP - trifosfato de adenosina
HPV - *Papillomavirus humano*
CDK - Quinase dependente de ciclina
DNA - ácido desoxiribonucleico
E - região inicial (*early*)
E2F - fator de elongação
INK - inibidor de quinase dependente de ciclina
IHQ - imunohistoquímica
L - região tardia (*late*)
RNA - ácido ribonucleico
NIC - neoplasia intra-epitelial cervical
PAP - teste de Papanicolaou
PCR - reação em cadeia da polimerase
PRb - gene supressor tumoral
P53 - gene supressor tumoral
pRb - proteína do retinoblastoma codificada pelo gene PRb
p53 - proteína supressora de tumor codificada pelo gene P53
HSV-2 - Herpes Simples tipo 2
HBV - vírus da hepatite B
HCV - vírus da hepatite C
HE – coloração por hematoxilina-eosina
INCA – Instituto Nacional do Câncer
CIS - carcinoma *in situ*
ARG - arginina
PRO - prolina
HIS - Hibridização *in situ*
CH - captura híbrida
DCBM - Departamento de Ciências Biomédicas
PB - pares de bases
UCS - Universidade de Caxias do Sul

RESUMO

O câncer de colo de útero, mundialmente, é um dos mais prevalentes dentre as mulheres. O adenocarcinoma cervical é uma neoplasia cuja origem está nas células da mucosa endocervical. Sua patogênese não está ainda bem compreendida, podendo-se encontrar o vírus HPV como um elemento associado a estas lesões.

A prevalência do HPV em adenocarcinomas cervicais apresenta ampla variação. O HPV tipo 16 e, especialmente, o HPV tipo 18, são os tipos mais freqüentemente associados a este tumor.

A proteína p16INK4, uma proteína relacionada ao ciclo celular, é superexpressa em muitos tumores humanos, incluindo o carcinoma de células escamosas e o adenocarcinoma cervical. Há evidências que correlacionam esta proteína com infecção por HPV.

O objetivo de nosso estudo foi o de identificar o DNA-HPV tipos 16 e 18 e verificar a correlação deste achado com a expressão da proteína p16INK4 em uma série de casos de adenocarcinoma cervical. A identificação do DNA-HPV foi realizada por meio do Nested-PCR e a expressão da proteína p16INK4 foi realizada pela técnica de imunohistoquímica.

O DNA-HPV tipo 16 foi o mais freqüente em nossa série (51,4%), seguido pelo DNA-HPV 18 (28,6%). Co-infecção (HPV 16 e HPV 18) foram encontrados em 5,7% dos casos. Uma forte expressão da proteína p16INK4 foi encontrada em associação com positividade para DNA-HPV tipos 16 e 18.

ABSTRACT

Cervical cancer is one of the most prevalent cancer in women around the world. Cervical adenocarcinoma arises in endocervical mucosal cells and, although HPV is identified in some cases, the pathogenic mechanisms involved in their development are still not understood completely.

HPV prevalence in cervical adenocarcinoma varies around the world. HPV 16 and specially HPV 18, are the most frequent types associated with this tumor.

The p16INK4, a cell cycle related protein, is superexpressed in many human tumors, including cervical squamous carcinomas. There are findings that correlate this protein with HPV infection.

The aim of our study was to identify HPV-DNA and verify the correlation of this findings with the expression of p16INK4 in a series of cervical adenocarcinomas. DNA-HPV analysis was performed by Nested-PCR to HPV 16 and HPV 18 and p16INK4 expression was verified by immunohistochemistry.

HPV 16 was the most frequent type in our series (51,4%) followed by HPV 18 (28,6%). Coinfection (HPV16 and HPV 18) was found in 5,7%. A very strong expression of p16INK4 was found in association with HPV-DNA positivity.

PALAVRAS-CHAVE

Adenocarcinoma de colo uterino; HPV 16 e 18; proteína p16INK4.

1. INTRODUÇÃO

Uma das maiores descobertas relacionadas à etiologia do câncer em seres humanos tem sido o reconhecimento de que o câncer de colo uterino é uma provável consequência de uma infecção por alguns tipos de HPV que demonstram tropismo por mucosas. Em termos de saúde pública, este achado é tão importante quanto a descoberta da associação de cigarros com câncer de pulmão ou entre infecção crônica pelo vírus HBV, HCV e o câncer de fígado. No Brasil, o INCA previu 19.260 casos novos de câncer de colo de útero para o ano de 2006, com um risco estimado de 20 casos a cada 100.000 mulheres. O câncer de colo de útero é o segundo mais comum entre as mulheres no mundo, sendo responsável, anualmente, por cerca de 471 mil casos novos e pelo óbito de, aproximadamente, 230 mil mulheres por ano. Entretanto, esses números podem estar subestimados em vista da subnotificação de novos casos, do alto número de óbitos notificados com causas mal definidas e dos casos notificados com informações insuficientes.

O adenocarcinoma é uma neoplasia cuja origem está nas células da mucosa endocervical. Sua frequência, neste sítio, é menor que a do carcinoma epidermóide e sua patogênese ainda não está bem compreendida, podendo-se encontrar o vírus HPV com uma prevalência variável, diferentemente do carcinoma epidermóide, onde há uma evidência muito forte da relação entre a presença deste vírus e o processo de carcinogênese.

A p16INK4 é uma proteína codificada pelo gene P16INK4 (também conhecido como CDKN2A) e sua função é inibir os reguladores do *check-point* da fase G1 do ciclo celular. A perda de sua expressão está associada com o aumento da proliferação celular, e, conseqüentemente, relacionada ao processo de malignização.

Estudos realizados mundialmente mostram diferentes prevalências do HPV em adenocarcinomas cervicais, mas, em especial, o HPV tipo 16 e o 18 têm sido encontrados com uma frequência maior nas diferentes localidades, sugerindo que estes dois tipos de HPV de alto potencial oncogênico possam ter um papel importante no desenvolvimento dos adenocarcinomas cervicais assim como nas neoplasias epidermóides e lesões pré-neoplásicas.

Muitos estudos apontam, também, a importância da identificação da proteína p16INK4 como um marcador tumoral a depender das características encontradas na imunohistoquímica. Têm sido sugerido que esta técnica possa auxiliar na diferenciação entre lesões malignas e benignas de adenocarcinoma ou carcinoma epidermóide de cérvix uterina.

Desta forma, torna-se importante identificar a presença de DNA-HPV por PCR e verificar a expressão da proteína p16INK4 por IHQ em pacientes com adenocarcinoma de colo uterino.

2. JUSTIFICATIVA

Estudo realizado na Universidade de Caxias do Sul intitulado “Determinação e Tipagem do *Papilomavirus humano* (HPV) em amostras da população feminina de Caxias do Sul”, demonstrou elevados índices de contaminação viral, associando o HPV com lesões pré-malignas e malignas da cérvix uterina. Neste mesmo estudo, o HPV 16 foi o de maior prevalência, em concordância com o maior número de carcinomas epidermóides identificados. Entretanto, há evidências de que o HPV 18 possa se encontrar em maior prevalência nos adenocarcinomas do que em carcinomas epidermóides. Esta relação, entretanto, ainda não foi verificada no nosso meio.

Muitos estudos vêm sendo realizados para a identificação de marcadores do ciclo celular e seu papel no processo da carcinogênese. A proteína p16INK4, assim como outros marcadores, mostra-se superexpressa nas lesões precursoras do câncer do colo uterino e tem sido tratada como um provável marcador biológico de progressão destas lesões. Entretanto, seu papel nos adenocarcinomas ainda não está claro.

A determinação, portanto, da presença de DNA-HPV em lesões glandulares malignas da cérvix uterina, procurando estabelecer uma relação etiopatogênica entre a presença do HPV, o tipo de HPV e o surgimento de neoplasias glandulares do colo uterino consiste em um estudo de grande relevância clínica e epidemiológica, considerando o aumento na incidência deste tipo de tumor nas últimas décadas. Paralelamente, a pesquisa da expressão da proteína p16INK4 nas amostras a serem estudadas e sua relação com a infecção pelo HPV tipos 16 e 18 auxiliará na compreensão da patogênese do adenocarcinoma de colo, uma vez que este mecanismo ainda não está bem compreendido.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O ADENOCARCINOMA DE COLO UTERINO

De 10% a 25% dos carcinomas de colo de útero são adenocarcinomas, carcinomas adenoescamosos, carcinomas indiferenciados ou outros tipos histológicos raros (Kumar *et al.*, 2005). Tem-se observado um aumento na incidência de adenocarcinoma durante as últimas décadas, particularmente nas mulheres jovens e brancas (Pirog *et al.*, 2000; Madeleine *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2003, Tawfik *et al.*, 2006). Os adenocarcinomas acometem preferencialmente mulheres na faixa dos 50 anos de idade. A etiologia dos carcinomas epidermóides do colo uterino, os quais são os mais frequentes, está ligada a infecção pelo HPV de alto potencial oncogênico. Entretanto, a patogênese do adenocarcinoma do colo uterino é muito menos compreendida. Enquanto o DNA do HPV é detectado em mais de 95% dos casos de carcinoma epidermóide da cérvix, a prevalência de DNA-HPV em adenocarcinomas varia significativamente, de 32% a 90%, dependendo do método de detecção utilizado (Anderson *et al.*, 2003). Alguns estudos têm mostrado que ele é tão prevalente em adenocarcinomas do colo uterino quanto em carcinomas epidermóides. Demonstrou-se uma incidência aumentada de adenocarcinomas cervicais em mulheres jovens, com prognóstico pior que o do carcinoma de células escamosas da cérvix. Associado a isso, HPVs de alto risco podem ter também um papel importante na carcinogênese da neoplasia glandular da cérvix, embora as taxas de infecção por HPV para o adenocarcinoma cervical tenham variado entre os vários estudos (Ishikawa *et al.*, 2003; Tawfik *et al.*, 2006). Neste contexto, a infecção pelo HPV 18 parece ser mais prevalente

em adenocarcinomas do que em carcinomas epidermóides (Wright *et al.*, 1994; Miranda *et al.*, 2000; Madeleine *et al.*, 2001).

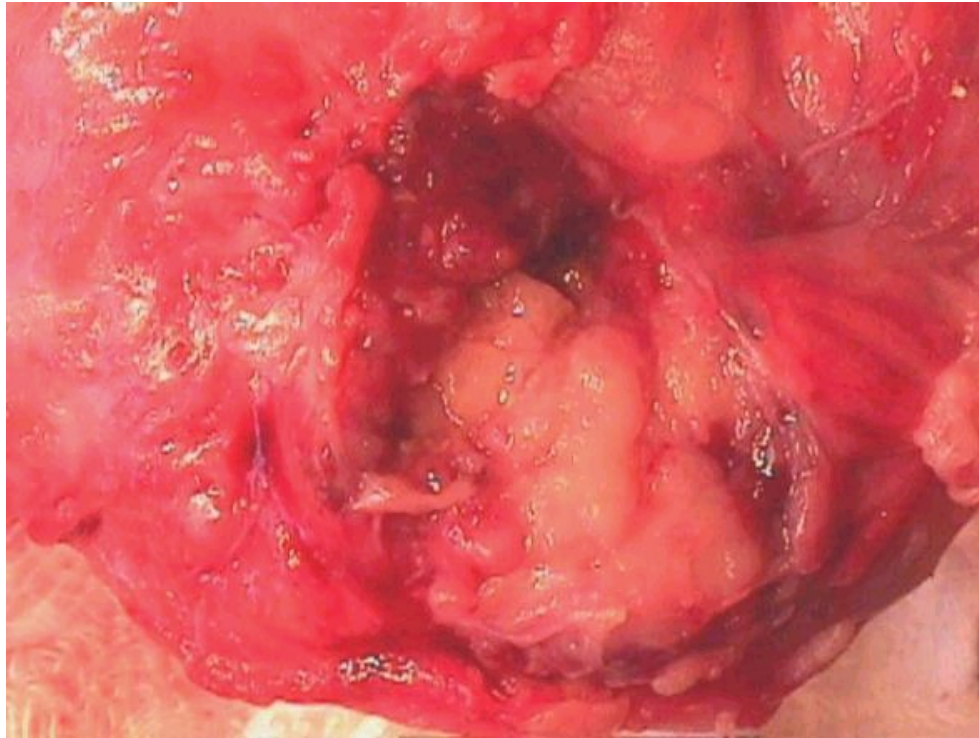


Figura 1: Peça cirúrgica de colo uterino com adenocarcinoma invasor.

Os adenocarcinomas cervicais incluem vários e diferentes tipos histológicos. A maioria dos tumores são adenocarcinomas mucinosos, que lembram epitélio endocervical e estão frequentemente associados com a presença de lesão escamosa intraepitelial, localizada na ectocérvice (Pirog *et al.*, 2000).

Os adenocarcinomas se originam da mucosa endocervical, inicialmente surgem como adenocarcinoma *in situ* (figura 2), que tem aproximadamente um quinto em frequência em relação à neoplasia escamosa. Os carcinomas adenoescamosos apresentam

um padrão misto, escamoso e glandular e acredita-se que se originem de células de reserva multipotentes situadas nas camadas basais do epitélio endocervical (Kumar *et al.*, 2005).

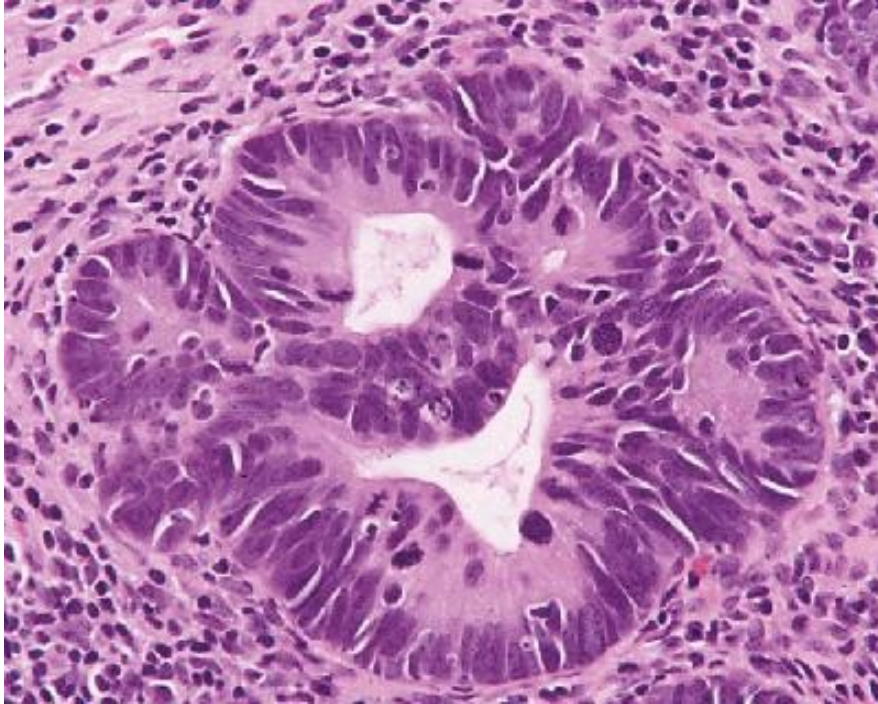


Figura 2: Adenocarcinoma endocervical in situ (modificado de [www.cytopathology.org / NIH /view.php?patientId=99](http://www.cytopathology.org/NIH/view.php?patientId=99))

Os fatores de risco incluem os relacionados com o risco em adquirir infecção pelo HPV, tais como: baixo nível cultural, início precoce das atividades sexuais e múltiplos parceiros sexuais. Além desses, os adenocarcinomas foram relacionados com obesidade, um conhecido fator de risco para o câncer de endométrio, e com o uso prolongado de anticoncepcionais orais (Pirog *et al.*, 2000).

Mais recentemente, Castellsalgúé *et al.* (2006) demonstraram associações estatisticamente significativas para risco de adenocarcinoma, tais como: baixa escolaridade,

comportamento promíscuo, uso de contraceptivos hormonais por longo período de tempo e soropositividade para HSV-2. O número de gestações, história de tabagismo e história positiva para *Chlamydia trachomatis* não foram estatisticamente significantes para o risco aumentado de adenocarcinoma (Castellsagué *et al.*, 2006).

3.1.1 Métodos Diagnósticos para o Adenocarcinoma

3.1.1.1 Citopatologia

O teste de PAP tem sido utilizado desde os anos 40 para avaliação citológica das células cervicais. O sucesso de programas de rastreamento em grande escala utilizando o PAP com o objetivo de reduzir os índices de câncer cervical invasivo, tem sido propagado na literatura. E, sem dúvida, é o teste de rastreamento com melhor relação custo-benefício utilizado na rotina da prática ginecológica (Papanicolaou, 1942; Falls, 1999). Por outro lado, nos Estados Unidos, a proporção de adenocarcinomas invasores em relação ao carcinoma de células epidermóides e a todos os cânceres cervicais dobrou entre 1973 e 1996, indicando que as práticas de rastreamento podem ser insuficientes para detectar uma proporção substancial de lesões precursoras de adenocarcinoma, as quais estão localizadas nas partes altas do canal endocervical, o que pode torná-las menos acessíveis à detecção (Castellsagué *et al.*, 2006). As alterações encontradas nas células do adenocarcinoma são evidenciadas na figura 3.

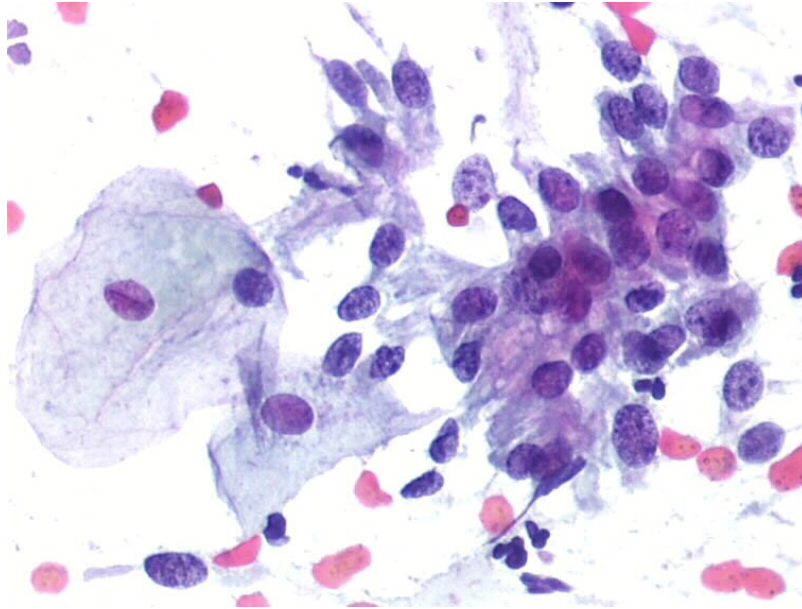


Figura 3 : Citopatológico de adenocarcinoma bem diferenciado da endocérvice: aglomerado de células pouco coesas, com bordos irregulares, formado por células colunares atípicas (aumento de 40x) (modificado de http://screening.iarc.fr/atlascyto_detail.php?flag=0&lang=4&Id=cyt14644&cat=F2c).

3.1.1.2 Histopatologia

O diagnóstico histopatológico dos adenocarcinomas é considerado padrão-ouro e nele baseiam-se, na prática assistencial, as decisões terapêuticas. Os adenocarcinomas, em geral, mostram estruturas glandulares invadindo o córion com revestimento por células que exibem atipias nucleares importantes (figura 5). A fase invasiva é precedida pela lesão *in situ*, na qual as células malignas não invadiram a membrana basal.

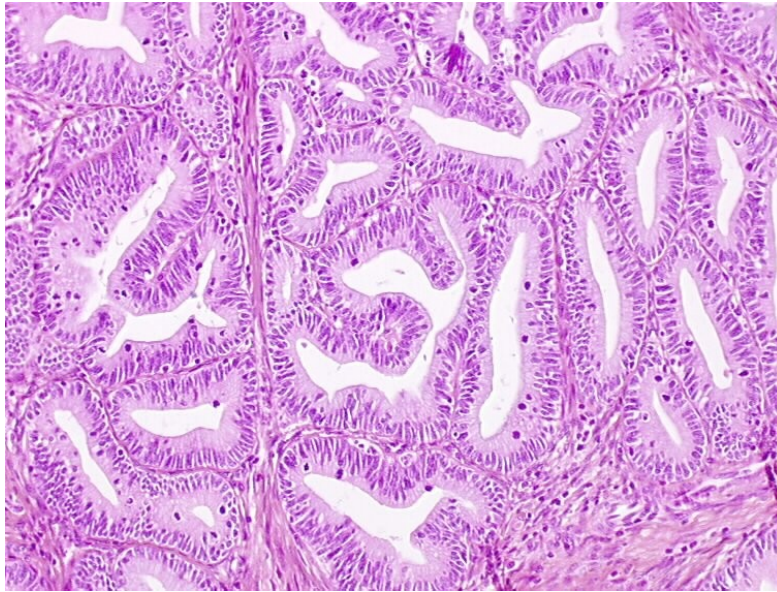


Figura 4: Histologia de adenocarcinoma endocervical invasor bem diferenciado (grau I) composto de túbulos (com epitélio pluri-estratificado), infiltrando o tecido conjuntivo. (Modificado de http://screening.iarc.fr/atlashisto_detail.php?flag=0&lang=4&Id=00002289&cat=F2c1)

Embora alguns autores tenham relatado elevado nível de concordância diagnóstica interobservador, ainda existe considerável discrepância, principalmente nas lesões limítrofes (Di Loreto & Alves, 1998). Embora as características histológicas das neoplasias cervicais intra-epiteliais sejam bem conhecidas, aplicações inconsistentes dos critérios morfológicos, bem como a existência de alterações escamosas e glandulares que mimetizam lesões malignas, podem resultar em significativa variabilidade interobservador e intra-observador (Keating *et al.*, 2001).

3.1.1.3 Colposcopia

A colposcopia é inefetiva em reconhecer lesões que acometem o canal endocervical, como é o caso dos adenocarcinomas de cérvix. Biópsias minimamente invasivas de áreas próximas ao orifício externo podem ser inadequadas, originando resultados falso-negativos. Adenocarcinomas altamente diferenciados das glândulas cervicais podem ser difíceis de serem reconhecidos histologicamente e lesões precursoras podem ser interpretadas como alterações reacionais. Isto é particularmente perigoso em lesões glandulares, as quais podem ter uma evolução mais rápida para fase invasora do que lesões intra-epiteliais escamosas (Negri *et al.*, 2003).

3.2 O VÍRUS HPV

O HPV pertence à família *Papillomaviridae*, gênero *Papillomavirus* (Howley *et al.*, 2001; de Villiers *et al.*, 2004). São vírus não-envelopados, de simetria icosaédrica, com diâmetro aproximado de 55nm, com DNA de dupla fita circular com cerca de 8.000 pb. São de alta espécie-especificidade e nenhum deles foi ainda cultivado em culturas celulares. Já foram identificados mais de 100 tipos de vírus do papiloma humano, distribuídos em dois grupos: HPV cutâneo e HPV de mucosa, constituindo o mais diverso grupo de vírus DNA envolvidos em doenças humanas (Giarrè *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2003). Os HPVs que infectam mucosas têm predileção pelo trato genital e estão subdivididos em dois grupos: os de baixo potencial oncogênico, os de alto potencial oncogênico e os de potencial oncogênico intermediário (tabela 1). Os HPVs de baixo potencial oncogênico (tipos 6, 11, 40, 42, 44, 61) são relacionados a lesões benignas exofíticas, enquanto que os de alto potencial oncogênico (tipos 16, 18 e 31) são relacionados às lesões intra-epiteliais e invasoras do colo uterino (Stoler, 1996; Villa, 1998; Candeias & Racz, 1999; Sedlacek,

1999). No grupo dos HPVs de baixo risco, os mais comuns são o 6 e o 11. No grupo de HPVs de alto risco ou alto potencial oncogênico, os mais frequentemente detectados são o HPV 16 e o HPV 18, embora um grande número de tipos menos comuns de HPVs de alto risco também tenham sido encontrados (tipos 31, 33, 35, 45) (Tawfik et al., 2006; Castellsagué *et al.*, 2006). Além destes, existe um grupo intermediário (tipos 26 e 54) para os quais ainda não existe base epidemiológica que defina seu potencial oncogênico (Silva *et al.*, 2006).

Tabela 1 : Classificação dos tipos de HPV por oncogenicidade cervical (modificado de Munoz, 2003).

Classificação de Risco	Tipos de HPV
Alto Risco	16, 18, 31, 33, 35 39, 45, 51, 52, 56 58, 59, 68, 73, 82
Provável Alto Risco	26, 53, 66
Baixo Risco	6, 11, 40, 42, 43, 44 54, 61, 70, 72, 81
Risco Indeterminado	34, 57, 83

Tsai *et al.*, (2005) estudaram a coexistência do DNA-HPV no colo uterino e no sangue periférico, tendo encontrado que cerca de um terço dos pacientes positivos para HPV no tecido cervical foram, também, positivos para HPV no sangue periférico, o que parece sugerir que a detecção de DNA-HPV no tecido cervical pode ser refletido por uma detecção direta do DNA-HPV no sangue periférico (Tsai *et al.*, 2005).

Verificou-se que testagem para HPV em mulheres pode auxiliar na identificação do risco para adenocarcinoma e carcinoma epidermóide, especialmente aquelas com HPV 16 ou 18. É possível que este teste seja ainda mais útil quando associado à curetagem cervical. (Anderson *et al.*, 2003).

3.2.1 GENOMA VIRAL E ONCOGENES

A infecção pelo HPV é manifestada por alterações na função ou na expressão dos genes do hospedeiro e a detecção destas alterações pode ter um importante papel na triagem e seguimento das pacientes afetadas. Diferentes tipos de HPV têm diferentes níveis de associação com o câncer, e este nível presumivelmente reflete a potência de suas respectivas oncoproteínas, codificadas pelos genes E6 e E7. A interação destes genes com o hospedeiro levam à desregulação do ciclo celular, manifestando-se pela expressão anormal de proteínas associadas ao ciclo celular tais como Ki-67, ciclina E e p16 (Keating *et al.*, 2001).

O genoma do HPV é composto por 9 a 10 genes, sendo 7 a 8 na região precoce (*Early*) e dois na região tardia (*Late*) (figura 6). Os genes precoces estão envolvidos na

replicação viral (E1 e E8), no controle da transcrição (E2 e E8), na maturação do vírus e alteração da matriz intracelular (E4) e no estímulo da proliferação e transformação celulares (E5, E6 e E7). A região tardia compreende dois genes, L1 e L2, que representam as proteínas principal e secundária do capsídeo, respectivamente (Villa,1998).

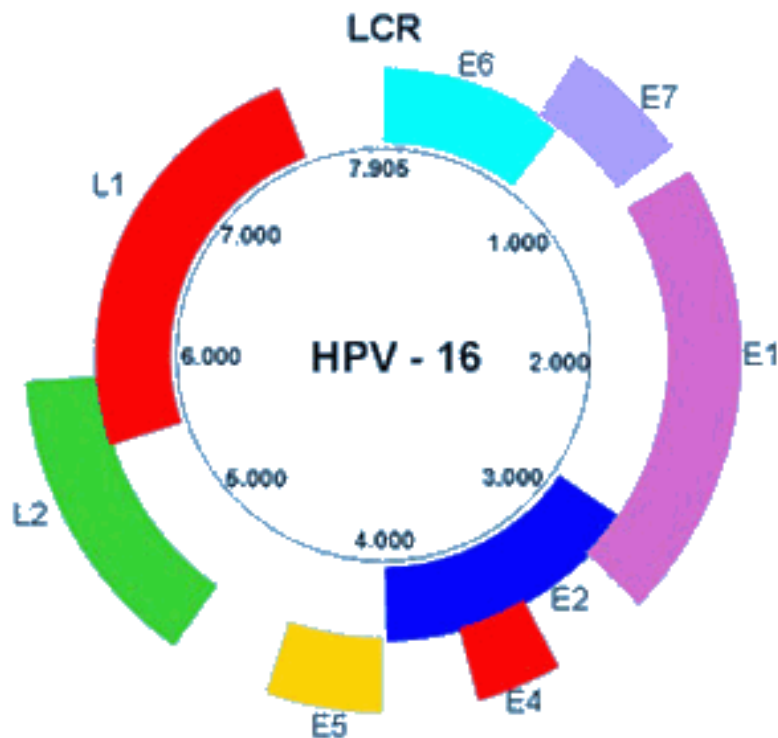


Figura 5: Representação esquemática do genoma do HPV-16, mostrando os genes da região inicial (E1 a E8), da região tardia (L1 e L2) e da região regulatória (LCR) (modificado de Munger & Howley, 2002).

Em geral, o câncer se desenvolve como uma consequência de um número de alterações genéticas que levam à ativação dos oncogenes ou à inativação dos genes supressores do tumor. A inativação destes genes supressores pode ser feita por diversos processos que incluem mutações puntiformes e deleção cromossomal (Dong *et al.*, 2001). As mutações dos genes Rb e P53, supressores de tumor, foram associados a doenças malignas hereditárias (retinoblastoma, síndrome de Li-Fraumeni) e têm sido encontradas em diferentes percentagens em tumores malignos esporádicos como carcinoma pulmonar de pequenas células, osteossarcoma, câncer de mama, de bexiga e de cólon (Wieland *et al.*, 1999).

A inativação de proteínas nucleares pRb e p53, mais do que a mutação dos genes correspondentes tem um papel essencial na carcinogênese induzida pelo HPV. O gene Rb está localizado no cromossomo 13 e o produto do gene, a pRb interage com o fator de transcrição celular E2F na fase G1 do ciclo celular (Wieland *et al.*, 1999).

As mutações em Rb ou inativações da pRb causam proliferação celular desordenada. A desregulação ou a proliferação é um degrau do desenvolvimento multiescalonado dos tumores malignos (Wieland *et al.*, 1999).

As razões para as diferenças de potencial oncogênico de cada subtipo de HPV na carcinogênese cervical permanecem obscuras. Entretanto, os oncogenes E6 e E7 podem ter um importante papel nas diferenças de potencial oncogênico de cada subtipo de HPV. As oncoproteínas codificadas pelos genes E6 e E7 têm a habilidade de repetir as proteínas reguladoras da célula hospedeira, especialmente os produtos dos genes supressores tumorais P53 e PRb. Estas alterações levam a degradação e a inativação funcional da pRb pelo produto do gene E7 (Sano *et al.*, 1998).

O gene P53 está localizado no cromossomo 17. A proteína celular p53 suprime a transcrição de alguns genes celulares, porém seu maior efeito supressor de tumor é devido a ativação transcricional dos genes que mantêm a estabilidade genômica. Por esta razão, a p53 tem sido chamada de “guardiã do genoma”. Após o dano do DNA celular, a expressão de p53 é estimulada. A p53 então ativa a expressão de certos genes celulares como o p21, o qual leva a interrupção do ciclo celular na fase G1 ou induz a apoptose (Wieland *et al.*, 1999).

O gene P53 pode apresentar um polimorfismo no códon 72. Esse polimorfismo pode codificar uma ARG ou uma PRO, determinando a presença de três genótipos (homozigoto para ARG (ARG/ARG P53), heterozigoto (ARG/PRO P53) ou homozigoto para PRO (PRO/PRO P53). De uma perspectiva funcional, os dois alelos parecem ser equivalentes, não interferindo na atividade da proteína. Todavia, alguns estudos sugeriram que pacientes ARG/ARG P53 teriam risco maior de desenvolver câncer cervical associado ao HPV. A proteína P53 que possui uma ARG na posição 72 apresenta velocidade de degradação maior do que a que possui uma PRO nesta posição em presença da proteína E6 do HPV-16 ou HPV-18. Todavia, esta relação entre ARG/ARG P53 e câncer de colo uterino associado ao HPV ainda não está totalmente estabelecida. Não se encontram evidências de correlação entre o polimorfismo no códon 72 do gene P53 e risco para câncer cervical HPV-positivo (Anschau *et al.*, 2005).

3.2.2 A EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR HPV

A prevalência estimada da infecção por HPV na população mundial de mulheres é de 2 a 44% (Bosch & de Sanjose, 2003). Estudos baseados em DNA combinados com

medidas de anticorpos tipo-específicos contra antígenos do capsídeo do HPV, têm mostrado que mais de 50% das mulheres sexualmente ativas estão infectadas por mais de um tipo de HPV genital em algum período no decorrer de suas vidas. (Baseman & Koutsky, 2005).

Fortes evidências sugerem que quase todos os adenocarcinomas são positivos para HPV. Foram encontrados DNA-HPV de alto risco em 100% de adenocarcinomas *in situ* e 94% em adenocarcinomas invasores (Zielinski *et al.*, 2003).

O HPV 16 é um dos tipos mais freqüentemente encontrados em mulheres com citologia normal, é também o tipo mais comum entre os casos de câncer cervical, conforme evidenciado na tabela 2. (Munoz *et al.*, 2003).

A maioria dos estudos indicam uma diminuição na prevalência do HPV com a idade, porém um estudo multicêntrico mostrou um pico de prevalência em mulheres abaixo dos 25 anos de idade, uma diminuição em mulheres entre 35-54 anos e um segundo pico depois dos 55 anos de idade (Herrero *et al.*, 2000).

Tabela 2: Prevalência de DNA-HPV tipo-específico entre mulheres infectadas por HPV (modificado de Munoz *et al.*, 2003).

Tipos de HPV	Porcentagem de mulheres infectadas (média de idade de 46 anos) *
16	24,3
18	7,3
31	4,2
45	3,5
35	2,7
58	2,3
6	2,3

*Grupo-controle baseado em população de mulheres de estudos em câncer cervical em nove países.

Quando estudados os tipos de HPV em câncer cervical, uma análise de 12 estudos conduzidos em 25 países estimaram a prevalência de HPV tipo-específico em 3085 casos de câncer cervical. A prevalência encontrada de DNA-HPV foi de 96% e os 15 tipos mais comuns foram, em ordem decrescente de frequência, HPV 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 39, 51, 73, 68 e 66. O HPV 16 e o HPV18 foram encontrados em 70% dos casos, e os oito tipos mais comuns (HPV 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 e 35) foram encontrados em 89% de todos os casos de câncer cervical pelo mundo (Clifford *et al.*, 2006).

3.2.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA O HPV

3.2.3.1 Citopatologia e Histopatologia

O diagnóstico citopatológico e histopatológico das alterações causadas pelo HPV nas células e tecidos é de grande importância, pois nele baseia-se a maior parte das decisões terapêuticas das lesões causadas pelo HPV e de suas conseqüências no trato genital (Di Loretto *et al.*, 1998).

Diferentemente do que acontece nas lesões de células escamosas, nas células glandulares endocervicais o HPV não produz alterações de caráter cito-arquitetural como a coilocitose, característica da infecção pelo HPV nas células escamosas.

3.2.3.2 Métodos Moleculares

Existem vários tipos de métodos moleculares para a detecção da infecção por HPV, como a hibridização *in situ*, a técnica de captura híbrida, a PCR e outros. A PCR é considerada padrão-ouro para detecção de infecção viral por HPV.

A PCR é um método capaz de amplificar quantidades diminutas de seqüências específicas de DNA-alvo em diversas milhões de vezes. Para realizar a PCR, podem ser usados esfregaços citológicos, lavados, biópsias transoperatórias de congelação ou tecidos embebidos em parafina. Também é necessário que a seqüência-alvo de nucleotídeos seja conhecida de modo que gere iniciadores de oligonucleotídeos apropriados que pareiam regiões específicas do DNA-alvo, o qual deve ser inicialmente isolado. Isso pode ser feito por uma digestão não-iônica detergente / protease ou por congelamento e aquecimento do material celular. Após o anelamento destes iniciadores, uma DNA polimerase termoestável, como a TAQ polimerase sintetiza novas fitas de DNA fita dupla com base na seqüência de nucleotídeos do DNA alvo. A concentração do DNA cresce exponencialmente. Após 35 ciclos, mais de 10 trilhões de cópias de DNA-alvo podem ser produzidas. Portanto, tão pouco quanto 10 a 100 moléculas de DNA, podem ser amplificadas (Filho *et al.*, 1998; Zahm *et al.*, 1999).

Embora seja menos específica que a citologia para o diagnóstico de lesões morfológicas (especialmente em mulheres jovens sexualmente ativas), a PCR para o HPV é mais sensível para a detecção de anormalidades morfológicas cervicais, tendo sido introduzido (em combinação com a citologia) nos Estados Unidos, para mulheres com mais de 30 anos de idade no rastreamento primário para câncer de colo uterino (Tawik *et al.*, 2006).

3.3 A PROTEÍNA p16 $INK4$

A proteína p16 é uma proteína supressora de tumor inibidora de CDK, produto do gene CDKN2A, que desacelera o ciclo celular por inativação das CDKs, as quais fosforilam a proteína Rb (figura 8).

Recentes estudos têm demonstrado que a expressão da p16 é marcadamente influenciada pela expressão da proteína Rb. A superexpressão da proteína p16 tem sido demonstrada em carcinomas do colo uterino devido a inativação funcional da proteína Rb pela oncoproteína E7 do HPV (Sano *et al.*, 1998). Em alguns cânceres como o carcinoma de células escamosas a p16INK4a é fortemente expressa quando a pRb é inativada pelo HPV E7 ou por mutação. O teste imunohistoquímico para a identificação de p16INK4a pode ser valioso para o reconhecimento de células epiteliais neoplásicas e displásicas do colo uterino (Ishikawa *et al.*, 2003)

A inativação da pRb é recíproca com a expressão da p16INK4, por vezes mostrando-se em co-expressão (Sano *et al.*, 1998).

Vários estudos têm demonstrado que o produto de dois genes precoces (*early*) do HPV, o E6 e E7, são proteínas transformadoras do vírus e estão diretamente envolvidas na indução da proliferação benigna e transformação maligna das células do hospedeiro (Giarré *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2001). A capacidade destes genes de imortalizar queratinócitos é explicada pela sua habilidade em interagir e neutralizar a função da pRb (Giarré *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2001). A pRb e outras proteínas têm um papel central no controle do ciclo celular.

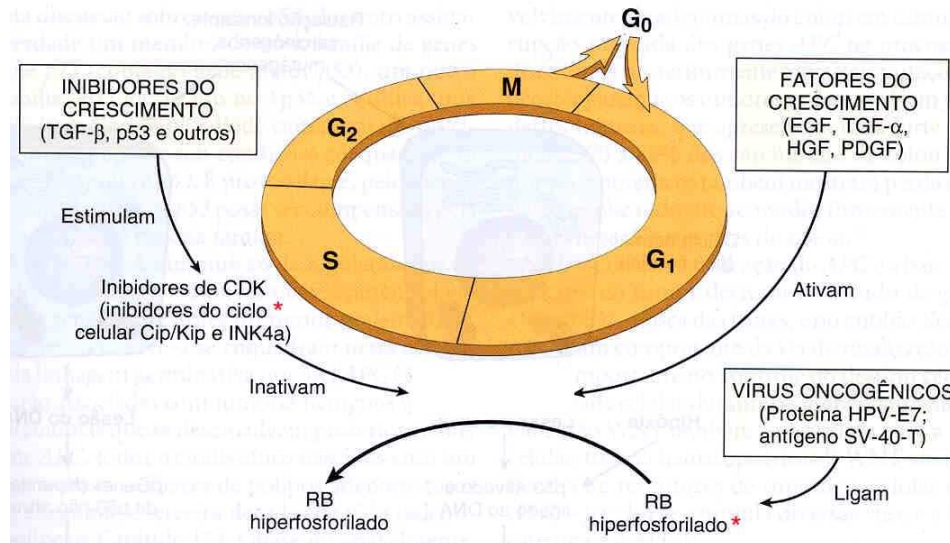


Figura 6: Desenho esquemático mostrando o ciclo celular e algumas proteínas reguladoras (modificado de Kumar *et al.*, 2005).

Em células quiescentes, a pRb é hipofosforilada e associada com E2F. Quando expostas a sinais mitogênicos, a transcrição de genes codificadores de ciclinas é iniciada. A seguir, há a inativação das quinases dependentes de ciclina 4 e 6 (CDK4 e CDK6), as quais fosforilam a pRb na fase do ciclo celular G1, causando a liberação do E2F (figura 9). Por fim, o E2F livre e ativado, promove a transcrição de um grupo de genes que codificam proteínas essenciais para a progressão do ciclo celular. Uma vez que a ativação de CDK4 e CDK6 representam a chave para o ciclo celular, existe um grande número de mecanismos que regulam a atividade destas quinases. Em particular, alguns membros da família de proteínas *INK4*, tais como p16, p15, p18 e p19, associam-se às CDK4 e CDK6 para inibir a

sua atividade. A expressão ectópica de p16, leva ao acúmulo de pRb hipofosforilado, seqüestro de E2F e conseqüente parada do ciclo celular na fase G1 (Giarré *et al.*, 2001).

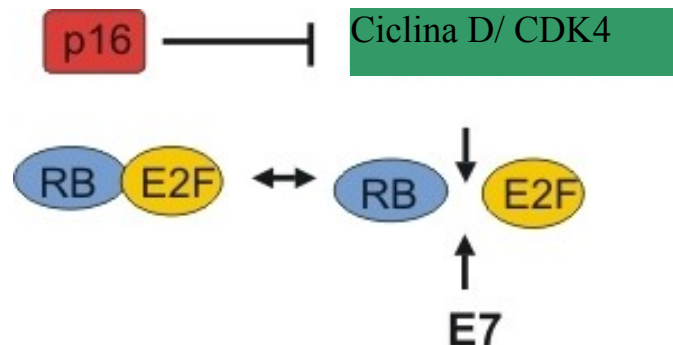


Figura 7: Representação esquemática mostrando o papel da proteína p16 na carcinogênese.

A interação do gene E7 do HPV 16 com a proteína pRb, análoga da fosforilação mediada por CDKs, resulta na liberação de E2F e estímulo para entrada em fase S do ciclo celular, mesmo na ausência de CDK4 e CDK6 e na presença de níveis elevados de p16 (Giarré *et al.*, 2001).

A p16INK4 é codificada pelo gene P16/INK4 (também conhecido como CDKN2A) e sua função é inibir os complexos CDK4 e CDK6, as quais, por sua vez regularm o “*check-point*” da fase G1 do ciclo celular (Kubo *et al.*, 1999; Sano *et al.*, 1998) É uma proteína produto de um gene de supressão tumoral, por vezes descrito como gene supressor tumoral múltiplo. O locus humano *INK4a/ARF* é localizado no cromossomo 9p21. A indicação mais precoce de que a ruptura da função da p16 pode estar associada com imortalidade, vem da observação de que a deleção de p16 é comum em linhagens de células tumorais imortais (Huschtscha *et al.*, 1999).

A perda da função da p16^{INK4} é análoga à inativação da pRb em células com imortalidade induzida por vírus de DNA, como por exemplo o HPV. Isto não é surpreendente, uma vez que a ação da p16^{INK4} é inibir a inativação da pRb pelas CDKs. Logo, espera-se que a perda funcional da p16^{INK4} tenha conseqüências similares à perda funcional pela pRb (Huschtscha *et al.*, 1999).

Estudos têm demonstrado que o nível de p16^{INK4} aumenta em células em estado senescente, ou seja, ocorre acúmulo de p16^{INK4} em vários tipos celulares como fibroblastos, células epiteliais e linfócitos T. É possível que o aumento dos níveis de p16^{INK4} possa ser devido ao progressivo encurtamento dos telômeros. A p16^{INK4} está implicada no controle do ciclo celular. Com base na observação de que elevados níveis de p16^{INK4} acompanham a senescência celular, a perda da expressão da p16^{INK4} está associada com aumento da fase proliferativa do ciclo celular. Dado que a senescência é uma importante barreira para a carcinogênese, é de se esperar que a inativação da p16^{INK4} seja um passo importante no processo de carcinogênese (Huschtscha *et al.*, 1999).

3.3.1 A p16^{INK4} como marcador tumoral

A p16^{INK4a} é um marcador útil para o diagnóstico de adenocarcinoma da cérvix uterina e seus precursores, fazendo a diferenciação de condições benignas (Negri *et al.*, 2003).

Alguns outros marcadores imunohistoquímicos são também potencialmente úteis para distinguir adenocarcinomas cervicais de formas benignas, a saber: MIB1, bcl-2, antígeno carcinoembriônico, p53 e outros. Padrões de expressão aberrantes de ciclinas e seus inibidores de CDK podem identificar marcadores prognósticos ou diagnósticos. A p16 é, porém, o marcador que se correlaciona mais fortemente com a diferenciação entre

condições malignas e benignas. Este marcador não parece ter um papel maior na progressão de adenocarcinoma *in situ* para invasor (Schorge *et al.*, 2004).

Nas lesões glandulares cervicais, a p16 é útil na distinção entre adenocarcinoma *in situ* (coloração difusamente positiva) e alterações benignas, incluindo metaplasia tuboendometrial e endometriose, as quais são geralmente p16-negativas ou focalmente positivas. O p16 pode ser usado juntamente com outros marcadores para distinguir entre adenocarcinoma cervical (positividade difusa) e um adenocarcinoma endometrial do tipo endometrióide (negativa ou focalmente positiva). Na distinção entre um adenocarcinoma endometrial e endocervical, o p16 é melhor utilizado juntamente com outros marcadores como receptores de estrogênios e antígeno carcinoembrionário monoclonal. Identificação de DNA-HPV também pode auxiliar, já que os adenocarcinomas cervicais geralmente são positivos e os adenocarcinomas endometriais são invariavelmente negativos (O' Neill *et al.*, 2006).

Um estudo sugere que, em combinação com a imunohistoquímica para p16 no tecido cervical, uma detecção direta do DNA-HPV 16 ou 18 no sangue periférico pode ser um método mais simples e alternativo como marcador específico para lesões cervicais associadas a HPV (Tsai *et al.*, 2005).

3.3.2 Imunohistoquímica

A IHQ é uma técnica usada para localizar antígenos específicos em células ou tecidos, baseada em reconhecimento antígeno-anticorpo. Este método já tem uma longa história, que iniciou em meados de 1940, quando Coons desenvolveu as técnicas de imunofluorescência para detectar antígenos em cortes de tecido congelado. Entretanto,

apenas no início dos anos 90, o método encontrou aplicação geral na patologia cirúrgica (Taylor *et al.*, 2002).

Um anticorpo é uma molécula glicoproteica produzida por linfócitos B, que é capaz de reconhecer antígenos com alta especificidade. Antígeno é uma molécula que, reconhecida pelo anticorpo, desencadeia uma resposta imunológica (Alberts, 1997; Ferreira & Rocha, 2004). A especificidade dos anticorpos pelo antígeno, faz deles poderosas ferramentas para o biólogo molecular (Albers, 1997). A produção de um anticorpo por um animal é induzida especificamente pela presença de um antígeno (Taylor *et al.*, 2002). Esta identificação poderá ser vista à microscopia óptica de transmissão, de acordo com vários procedimentos, em que se incluem os que empregam imunocomplexos enzima-antienzima e métodos com marcação prévia, como a avidina-biotina-peroxidase (Filho & Alves, 1998).

Em tese, os anticorpos monoclonais podem ser considerados mais específicos, já que reconhecem apenas o epítipo para o qual se dirigem. Em contrapartida, os anticorpos policlonais geralmente permitem sistemas de detecção mais sensíveis por reconhecerem uma coleção de sítios (Filho & Alves, 1998).

Este método baseia-se no reconhecimento de algumas características antigênicas através do uso de anticorpos monoclonais contra a p16^{INK4} (Filho & Alves, 1998).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Estudar a presença de HPV 16 e 18 e da proteína p16INK4 em adenocarcinomas cervicais.

4.2 Objetivos Específicos:

4.2.1 Identificar a presença de HPV 16 e HPV 18 nas lesões de adenocarcinoma cervical.

4.2.2 Avaliar a expressão da p16INK4 em adenocarcinomas cervicais.

4.2.3 Correlacionar a expressão da p16INK4 com os tipos de HPV presentes nas neoplasias.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA

Estudo retrospectivo, envolvendo 44 amostras de biópsia emblocadas em parafina com diagnóstico histológico de adenocarcinoma de colo uterino. As biópsias eram do período de Janeiro de 2000 a Janeiro de 2007, cedidas pelo Laboratório de Patologia do DCBM, Universidade de Caxias do Sul; Laboratório de Patologia do Hospital Geral de Caxias do Sul e do Laboratório Diagnose (Caxias do Sul e Bento Gonçalves).

Os exames anátomo-patológicos foram processados previamente pelo método de rotina de embebição em parafina de cortes histológicos de 3 μm de espessura, utilizando-se coloração padrão pela HE com posterior análise por microscopia óptica convencional de transmissão.

A figura 10 demonstra um fluxograma ilustrando as etapas realizadas na condução do experimento:

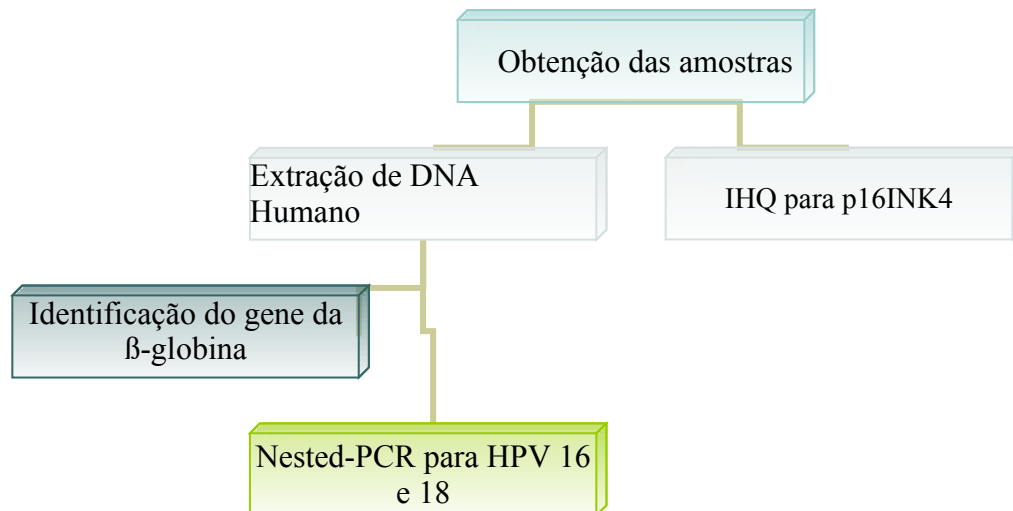


Figura 8: Fluxograma ilustrando a condução do experimento.

5.2 EXAME HISTOPATOLÓGICO

A análise das lâminas histológicas obedeceu critérios morfológicos conforme padrão diagnóstico da Organização Mundial de Saúde, sendo que o material foi classificado como adenocarcinoma *in situ*, adenocarcinoma invasor ou adenocarcinoma associado a lesão escamosa. A revisão dos casos foi realizada por dois patologistas experientes.

Em sua maioria, pôde-se identificar a proliferação de glândulas ramificadas, cujas células são muito semelhantes às do epitélio endocervical, inclusive com produção de muco. Atipias nucleares consistentes com malignidade, como condensação da cromatina, espessamento da membrana nuclear e presença de nucléolos são critérios celulares para a malignidade das lesões. O adenocarcinoma *in situ* constitui-se de lesões que ainda não ultrapassaram a membrana basal do epitélio, ao contrário do que ocorre no adenocarcinoma invasor.

As alterações presentes em cada caso foram listadas em um protocolo individual (Anexo 2).

5.3 IMUNOHISTOQUÍMICA

No material histopatológico, foi realizado exame IHQ para detecção da proteína p16INK4. Foram feitos cortes histológicos com 4 µm de espessura montados em lâminas de vidro com extremidade fosca, silanizadas. As lâminas silanizadas foram preparadas em uma bateria composta por um banho de acetona (500ml) por 30 segundos, seguindo-se de um banho de 5 minutos em uma solução composta de 475ml de acetona acrescidos de 25ml de aminopropiltrimetoxisilano 97% (*Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany*). Após, foram realizados mais dois banhos em 500ml de acetona por 30 segundos cada, seguidos de secagem em estufa a 60°C.

O processo de IHQ, pelo sistema EnVision, foi realizado utilizando-se *Cintec p16INK4 Histology Kit (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)*, conforme instruções do fabricante, seguindo as seguintes etapas:

- a) desparafinização;
- b) hidratação;
- c) recuperação antigênica através do uso de solução própria contida no kit;
- d) bloqueio da peroxidase através do uso do reagente próprio presente no kit;
- e) aplicação do anticorpo primário (p16INK4 rato anti-humano, clone E6H4), do polímero enzimático e do reagente para controle negativo (figura 11);
- f) aplicação do cromogeno;
- g) contracoloração com hematoxilina de Harris

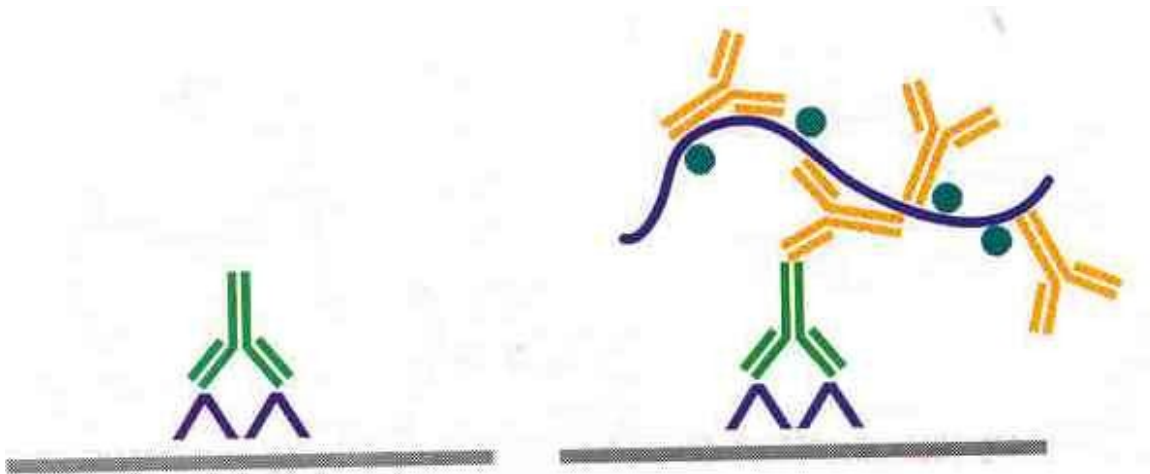


Figura 9: Aplicação do anticorpo primário e aplicação do polímero enzimático.

A expressão da *p16INK4* por meio de IHQ produz padrões de coloração marcantes. As células que apresentam expressão da *p16INK4*, mostram-se coradas de marrom, podendo esta coloração ser visualizada tanto no núcleo, quanto no citoplasma (figura 12). Por outro lado, as células normais coram-se apenas pela hematoxilina utilizada na contra-coloração, que produz uma tonalidade rosa azulada.

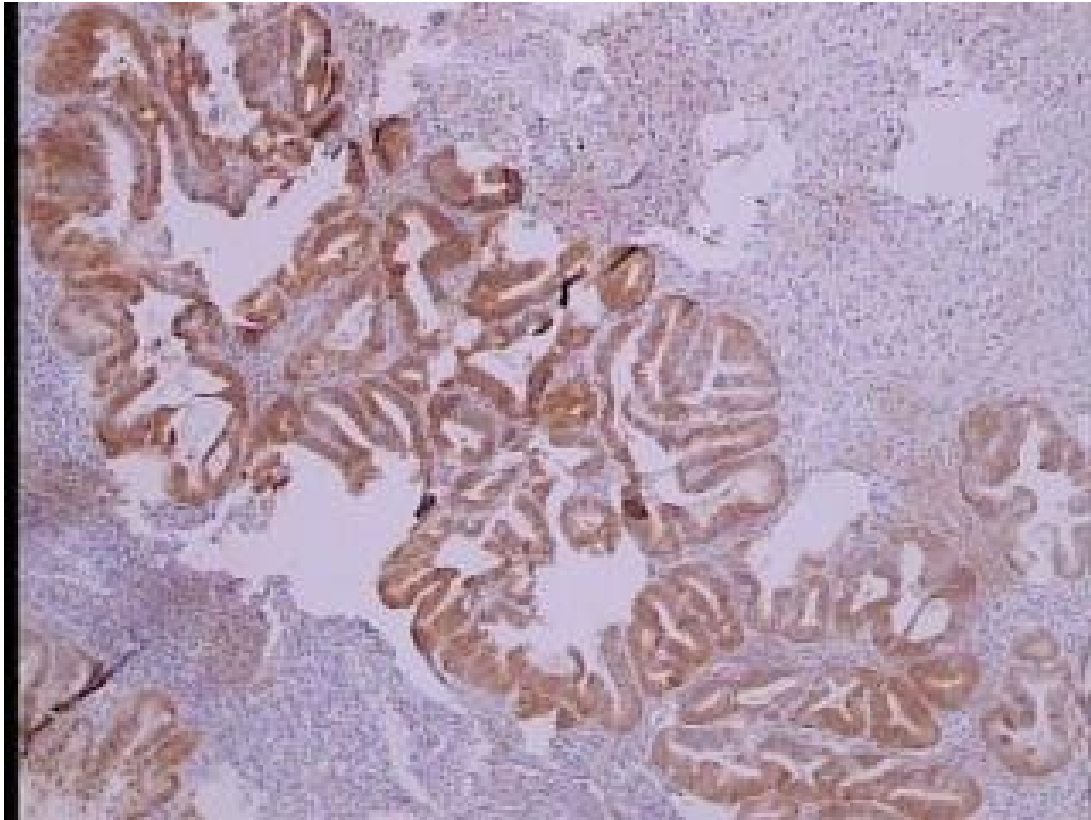


Figura 10: Fotomicrografia realizada por meio de microscópio óptico (aumento de 40X) mostrando a coloração típica da expressão da p16INK4, evidenciada por IHQ.

5.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA p16INK4

A análise da expressão da p16INK4 foi realizada utilizando-se vários métodos, conforme figura 13.

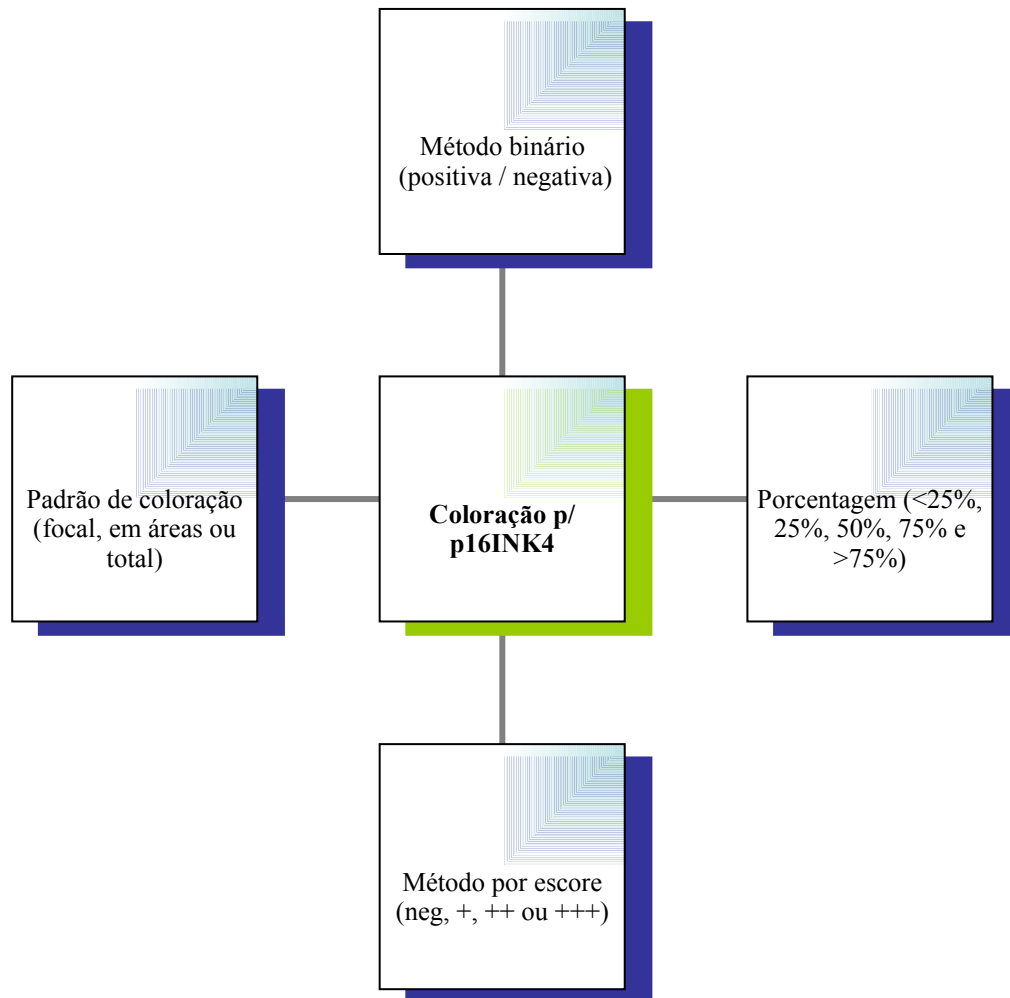


Figura 11: Métodos de graduação utilizados para a análise da coloração para p16INK4.

Método binário: Reação negativa quando menos de 5% das células da lesão se coram e positiva quando mais que 5% das células se coram;

Método por escore: Reação negativa quando há ausência de células coradas, 1+ quando o número mínimo de células está corado, 2+ quando um número moderado de células está corado e 3+ quando um número acentuado de células está corado. (Klaes *et al.*; 2001; Murphy, 2003; Agoff *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004);

Método de percentagem de células coradas: Esta graduação avalia o percentual de células coradas (positivas) em relação ao total de células da lesão. Este método foi feito tomando-se como base quatro campos de grande aumento (400x) de cada caso. Foram feitas 4 fotomicrografias impressas em papel. Cada fotomicrografia foi dividida em quatro quadrantes, sendo realizada a contagem manual das células para obtenção do valor que corresponde à percentagem (figura 14).

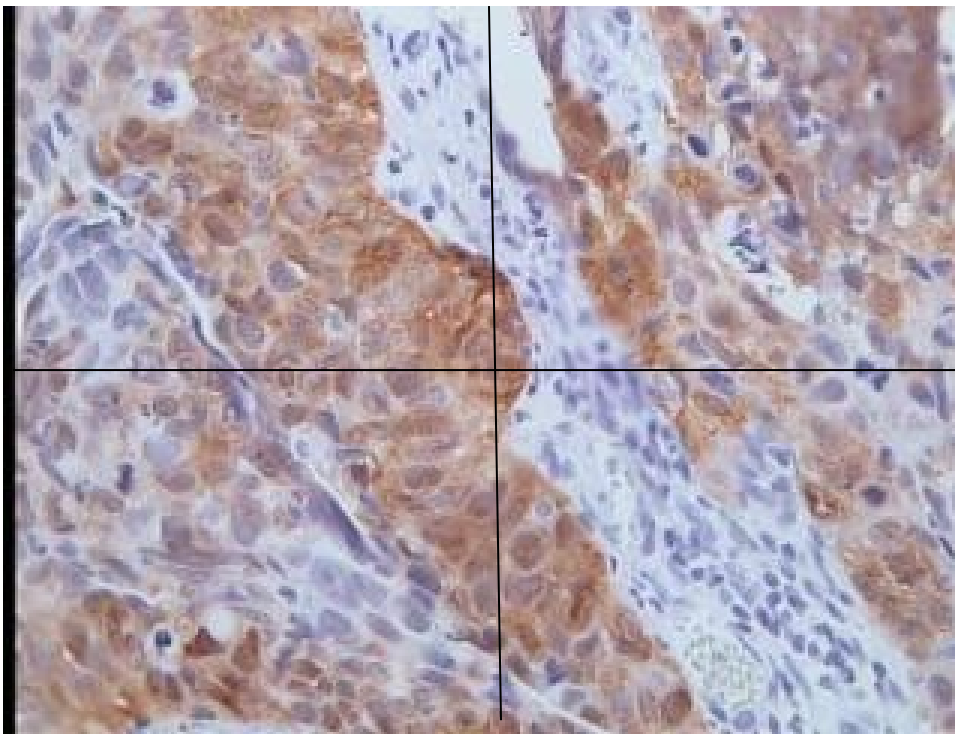


Figura 12: Fotomicrografia em grande aumento (400 X) impressa e dividida em quatro quadrantes para realização do método percentual de positividade para a p16INK4.

5.5 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE DNA-HPV

5.5.1 Extração de DNA

A determinação da presença de DNA-HPV foi realizada através do método da reação em cadeia da polimerase (PCR). O material proveniente de blocos de parafina foi submetido a cortes histológicos com 15 µm de espessura.

A retirada da parafina do tecido foi realizada por meio da sua solubilização em xileno em temperatura ambiente com posterior adição de etanol. Após, o tecido foi submetido à digestão enzimática com proteinase K. Nesta etapa, adicionou-se à solução 17,5 µL de proteinase K (20 mg/mL), seguido de uma agitação em vórtex. Após ter sido incubado *overnight* à temperatura de 55° C, seguiu-se à desnaturação da proteinase K a 94° C por 10 minutos.

A seguir, procedeu-se a extração de DNA das amostras, utilizando-se o kit *Wizard® Genomic, DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, Wi, USA)*, conforme instruções do fabricante.

5.5.2 Realização da Nested-PCR para DNA-HPV 16 e 18

Para verificar a integridade da amostra, foi realizado um PCR para o gene da β-globina humana, com o uso dos primers GH20 e PCO4 que resultam em um produto de PCR de 268 pb (Saiki *et al.*, 1988). Para a reação foi utilizado o *Kit Wizard® Genomic, PCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, Wi, USA)*, em um volume final de 20 µL. As condições de ciclagem foram as seguintes: cinco minutos de desnaturação a 95 ° C e 40 ciclos com um minuto de desnaturação a 95 ° C, um minuto de anelamento a 52 ° C e um minuto de extensão a 72 ° C, seguido de cinco minutos de extensão final a 72 ° C.

Após, as amostras foram submetidas à Nested-PCR, a qual foi utilizada para detectar HPV DNA com primers específicos para as regiões E6/E7 do HPV 16 ou 18 (Ishikawa *et al.*, 2003). Os primers externos para o PCR específico para o HPV 16 foram 5'- TGTCAAAAGCCACTGTGTCC -3' (nt. 419-438) e 5'- GAGCTGTCATTTAATTGCTC -3' (nt. 637-656). Os primers internos para o PCR para o HPV 16 foram 5'- TCGGTGGACCGGTCGATGTA -3' (nt. 493-512) e 5'- GATCAGTTGTCTCTGGTTGC -3' (nt. 606-625). Os primers externos para o PCR específico para o HPV 18 foram 5'- TGCCAGAAACCGTTGAATCC -3' (nt. 426-445) e 5'- TCTGAGTCGCTTAATTGCTC -3' (nt. 674-693). Os primers internos para o PCR específico para o HPV 18 foram 5'- ATAGCTGGGCACTATAGAGG -3' (nt. 492-511) e 5'- TGCAATGTTGCCTTAGGTCC -3' (nt. 596 – 615). Nas reações de PCR, foi usado uma concentração de 20 mM de cada primer.

Foram incluídos controles positivos e negativos na reação. O controle positivo foi uma amostra HPV positivo já tipado pelo laboratório de biologia molecular. O controle negativo utilizado foi um tubo com a mistura da reação, porém sem DNA.

Da mesma forma que a testagem para o DNA da β -globina, para a identificação do HPV 16 e 18, utilizou-se um volume final de 20 μ L. Para a reação foi utilizado o *Kit Wizard® Genomic, PCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, Wi, USA)*.

A amplificação do primeiro e do segundo PCR, tanto para o HPV 16 quanto para o HPV 18, foi realizada através da utilização de 30 ciclos em termociclador (PTC-100 *Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Waltham, Massachusetts, USA*). Cada ciclo incluiu 5 minutos de desnaturação a 95° C, um minuto de anelamento a 54° C, um minuto de alongamento da cadeia a 72° C. No Nested utilizou-se uma temperatura de anelamento de 58° C (Ishikawa *et al.*, 2003).

Os amplicons foram analisados em gel de poliacrilamida corados com prata. A identificação da presença de DNA do HPV16 se deu através da identificação de uma banda de 237 pb no primeiro PCR e uma banda de 132 pb no Nested (figura 15). Para o HPV18, 267 pb no primeiro PCR e 123 pb no Nested (figura 16).



Figura 13: Gel de poliacrilamida com as bandas de 132 pb das amostras HPV 16 positivas.

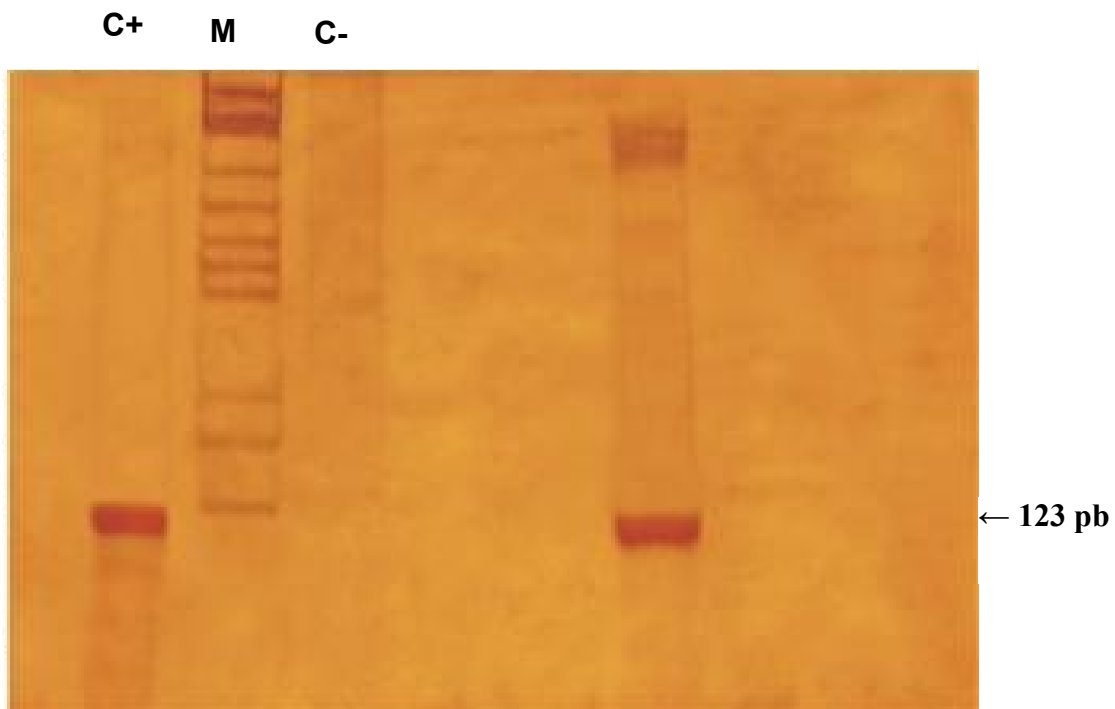


Figura 14: Gel de poliacrilamida com as bandas de 123 pb das amostras positivas para HPV 18.

Antecedendo o início da pesquisa, foi elaborado um termo de compromisso de confidencialidade e uma solicitação de dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido, os quais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Caxias do Sul. (anexo 1).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 RESULTADOS DESCRITIVOS DA AMOSTRA

Inicialmente foram obtidas 44 amostras de biópsias de colo uterino de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma cervical; destas, foram excluídas cinco amostras devido à insuficiência de tecido neoplásico nos blocos de parafina, o que dificultou a realização da IHQ e dos testes de biologia molecular. Das 39 amostras restantes, em quatro amostras (10,26%) não foi possível a realização do Nested-PCR para o HPV 16 e 18 devido ao fato de não termos encontrado o gene da β -globina humano, ou seja, não se evidenciou a presença de DNA humano viável nestas amostras (figura 17). O Nested-PCR foi realizado, portanto, em 35 amostras (89,74%). Em quatro casos não foi executada a IHQ devido à parada de fornecimento, pelo fabricante, do kit para a realização deste teste.

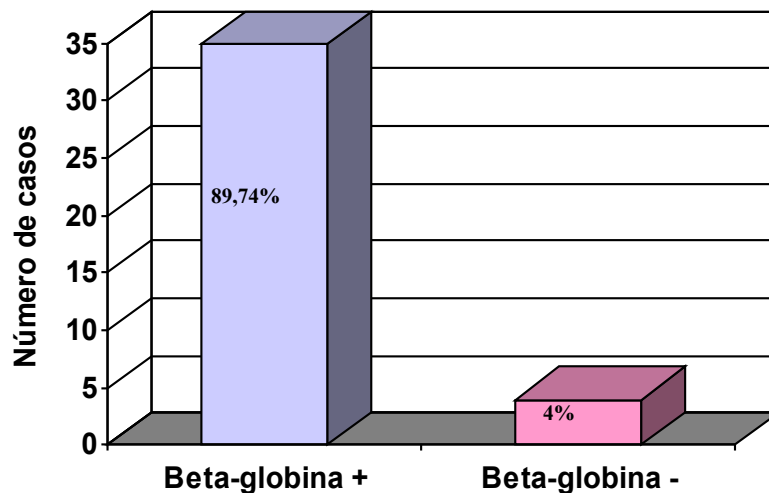


Figura 15: Distribuição das amostras conforme a presença do gene da β -globina.

Resultados semelhantes para o achado de DNA humano viável foram descritos por Cooper, *et al.* (2004), que relatam uma boa qualidade de DNA de amostras extraídas de material embebido em parafina, com sucesso em cerca de 80% dos casos. Unger *et al.* (1998) relataram sucesso em extração de DNA-HPV de material embebido em parafina, variando entre 64 a 94,1% estando relacionado ao tempo de estocagem do material.

Serth *et al* (2000) e Srinivasan *et al* (2002) apontam que provavelmente o grande responsável pelos resultados insatisfatórios, encontrados em alguns estudos, na extração de DNA humano das amostras embebidas em parafina esteja relacionado à fixação em formaldeído (formol 10%). Vários estudos têm sugerido que a perda de material genético pela ação do formaldeído, possa chegar a 70%, dependendo da temperatura do conservante, do tempo de fixação (não deve ser superior a seis horas), da concentração de sal e do pH, o qual, quanto mais baixo, maior é a perda. (Srinivasan *et al.*, 2002; Cross, *et al.*, 1990; Yagi *et al.*, 1996; Diaz-Cano e Brady, 1997).

6.2 RESULTADO DA HISTOPATOLOGIA

Dos 35 casos de adenocarcinoma avaliados, 15 foram classificados como carcinoma *in situ* (42,86%) e 20 casos (57,14%) como carcinoma invasor (figura 18). Todos os casos avaliados foram classificados como adenocarcinomas de tipo endocervical (figuras 19 e 20). Não se observou, neste estudo, outros tipos de adenocarcinomas.

A maior parte dos diagnósticos de adenocarcinoma é realizado em lesões já invasoras. Existe ainda uma certa dificuldade em se obter diagnóstico de lesões glandulares neoplásicas precoces no colo do útero devido à sua localização endocervical. (Negri *et al.*, 2003).

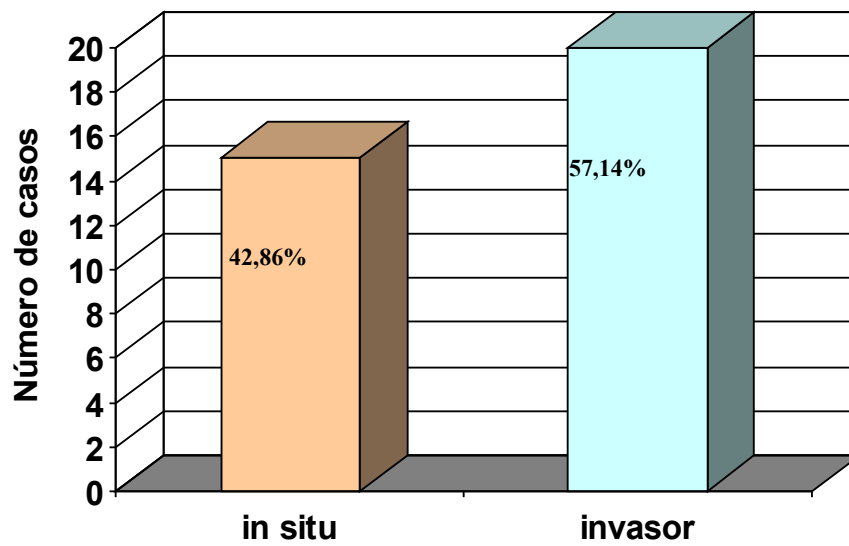


Figura 16: Distribuição das amostras conforme a presença ou ausência de invasão.

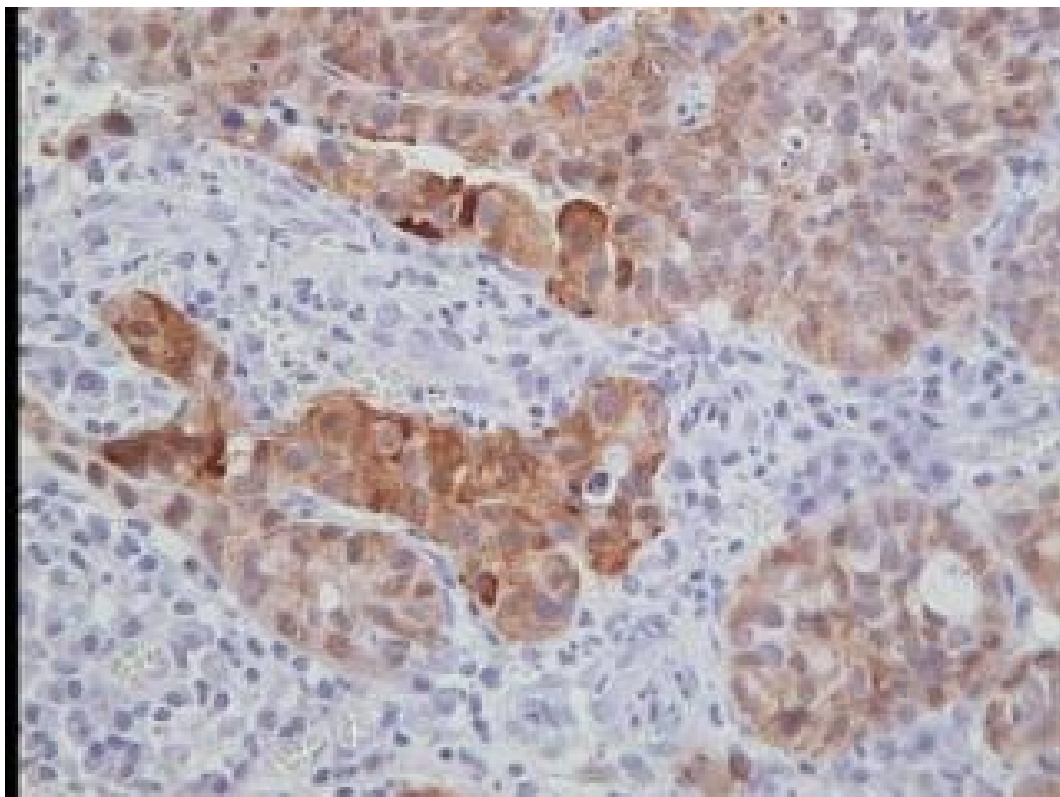


Figura 17: Corte histológico de um adenocarcinoma de colo uterino invasor visto em microscopia óptica com aumento de 100 X.

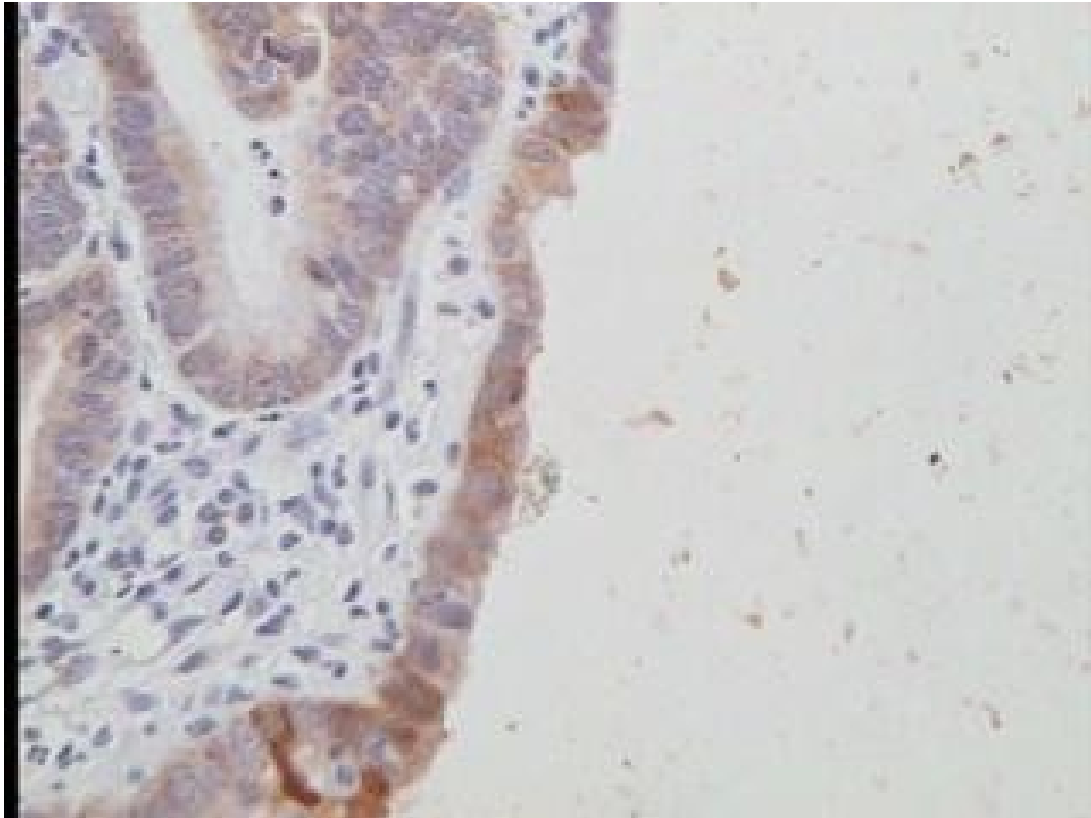


Figura 18: Corte histológico de um adenocarcinoma de colo uterino *in situ* visto em microscopia óptica com aumento de 100 X.

Dos 35 casos analisados, apenas quatro casos de adenocarcinoma apresentavam associação com lesão escamosa, resultado diferente do encontrado por Maiyer *et al.*, (1980), que relatam um percentual de 43% de coexistência entre neoplasia intra-epitelial cervical e adenocarcinoma de colo, sendo 2% com carcinoma de células epidermóides.

6.3 RESULTADOS ENCONTRADOS NO NESTED-PCR PARA DNA-HPV TIPOS

16 E 18

Inicialmente, submeteu-se parte das amostras à PCR convencional, utilizando-se o conjunto de iniciadores genéricos para HPVs, PGMY 09/11 (Gravit *et al.*, 2000), capazes de amplificar 450 pb do gene L1 de diversos tipos de HPVs anogenitais.

Muito provavelmente, devido ao fato de se estar trabalhando com um grupo de amostras estocadas em parafina, as quais sofrem um processo químico prévio para a confecção dos blocos, além de terem sofrido degradação com o tempo de armazenamento nos laboratórios de patologia, não se obteve positividade para DNA-HPV nestas amostras. Sabe-se que altos índices de positividade são encontrados em amostras a fresco utilizando-se esta técnica, o que induz a utilização de um método mais sensível e específico capaz de detectar DNA-HPV em materiais com elevado potencial de dificuldade técnica para obtenção dos mesmos resultados.

Apoiando essas hipóteses para tal resultado, Schorge *et al.*, (2004) relatam que a detecção de DNA-HPV em adenocarcinomas cervicais pode requerer uma técnica mais sensível devido a uma carga viral mais baixa, menores partículas virais epissomais e perda de porções do genoma viral durante a integração. Além disso, o sucesso da amplificação de DNA-HPV por PCR pode ser reduzida pela fragmentação do DNA como um resultado da fixação em formol e emblocamento em parafina.

Pirog *et al.*, (2000) também encontrou dificuldade na detecção de DNA-HPV em adenocarcinomas de colo, em contraste com carcinomas de células escamosas, o que poderia ter sido atribuído a uma carga viral mais baixa encontrada nas lesões glandulares comparadas com as lesões escamosas. Além disso, o autor sugere que o epitélio glandular

não suporta infecção viral produtiva e DNA-HPV nas neoplasias endocervicais está geralmente presente na forma integrada.

Neste contexto, optou-se por submeter as amostras à Nested-PCR com primers específicos para as regiões E6 e E7 do HPV 16 e HPV 18, uma técnica mais sensível que a anterior, pois realizar um estudo retrospectivo, por meio de técnicas de biologia molecular, com revisão de casos e análise de amostras emblocadas em parafina e armazenadas por longo tempo em laboratório de patologia pode requerer a utilização de técnicas mais sensíveis devido à degradação do material genético a ser estudado.

Dos 39 casos submetidos à identificação do gene da β -globina, 35 casos mostraram amplificação para o gene da β -globina humana (89,74 %), confirmando a adequabilidade da amostra em relação à presença de DNA humano viável.

Com relação ao DNA-HPV, dos 35 casos, a freqüência de positividade para o vírus foi de 74,30% (26 casos), enquanto que 25,70% (9 casos) não mostraram amplificação dos genes E6 e E7 dos HPVs 16 ou 18 (figura 21). Nossa taxa de prevalência de HPV 16 e 18 foi semelhante a encontrada em outros estudos, os quais mostraram uma prevalência de 68 a 84% de positividade. (Chen *et al.*, 1993; Kristiansen *et al.*, 1994). Achados semelhantes foram evidenciados por Anderson *et al.*, (2003), os quais encontraram 76% de positividade para HPV em suas amostras de adenocarcinoma.

Achados de positividade um pouco menores foram encontrados por Ishikawa *et al.*, (2003), os quais evidenciaram positividade para o DNA-HPV 16 e 18 em 65,3% (32) das amostras estudadas de adenocarcinoma, não tendo ocorrido amplificação em 34,7% (17) das amostras. Da mesma forma, Tawfik *et al.*, (2006) encontraram 62,6% de identificação de DNA-HPV em seu estudo, com 38% de negatividade para ambos HPV16 ou 18.

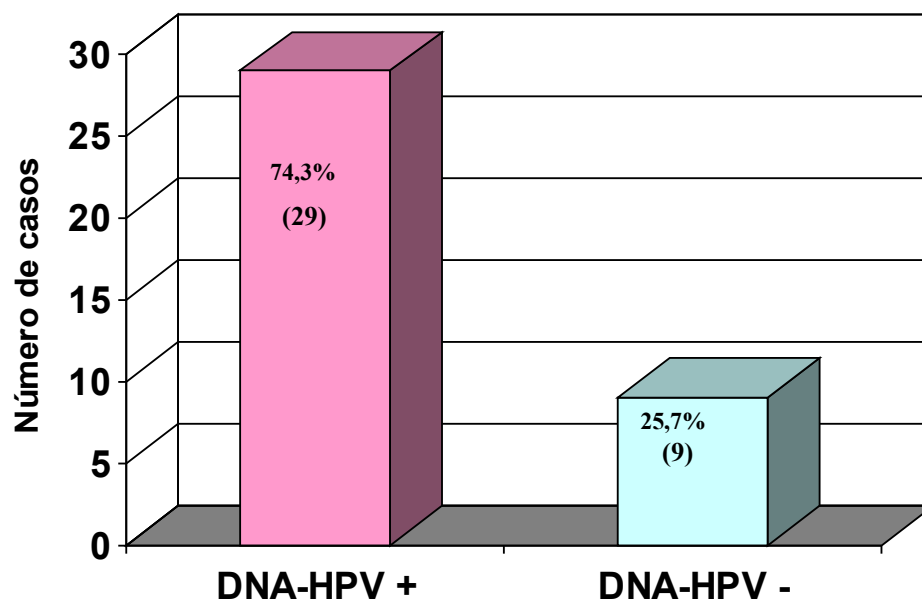


Figura 19: Distribuição da presença de DNA-HPV 16 e 18 por Nested-PCR.

A tabela 3 mostra a distribuição da presença de DNA-HPV relacionada com a presença ou ausência de invasão nas amostras, em números absolutos e percentuais.

Tabela 3: Positividade de DNA-HPV relacionada a presença ou ausência de invasão.

	DNA-HPV + (n = 22)	DNA-HPV - (n = 09)	P
Adenocarcinoma <i>in situ</i>	08 (36,1%)	04 (44,4%)	0,7 *
Adenocarcinoma invasor	14 (63,9%)	05 (55,6%)	

* Fisher exact test

A porcentagem de adenocarcinomas *in situ* com a presença do DNA-HPV foi de 36,1 % dos casos, enquanto que de carcinoma invasor foi de 63,9% no grupo de casos DNA-HPV positivos. Já no grupo DNA-HPV negativos, 44,4% eram adenocarcinoma *in situ* e 55,6%, adenocarcinoma invasor. Estes resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Resultados semelhantes foram encontrados por Tawfik *et al.*, (2006), que observaram 60% de positividade para DNA-HPV e 30% de negatividade no grupo de adenocarcinoma invasor. Estes pesquisadores, realizaram ainda a prevalência dos diferentes tipos de HPV nos subtipos histológicos de adenocarcinoma invasivo e no adenocarcinoma *in situ*, que também não apresentou diferença significativa entre os grupos.

A maioria das amostras de adenocarcinoma cervical submetidas à Nested-PCR foram positivas para a presença de DNA-HPV (74,3%), sugerindo que estes resultados estejam de acordo com a elevada prevalência de infecções por HPV em nosso meio. Com relação à presença deste vírus em adenocarcinomas, ainda não se tem ao certo a real prevalência em nosso meio e ainda se necessita uma maior elucidação dos mecanismos de atuação do HPV na fisiopatogenia dos adenocarcinomas.

Um achado de 25,7% de amostras negativas para o HPV tanto 16 quanto 18 nos faz pensar que talvez possam existir outros tipos de HPVs presentes nestas lesões influenciando no processo neoplásico, o que não foi testado neste estudo. Não se sabe, ao certo, a prevalência de lesões de adenocarcinoma realmente negativas para os tipos de HPV existentes.

Não foi observada a amplificação nos controles negativos utilizados na reação, descartando-se a hipótese de contaminação das amostras.

6.4 RESULTADO DA IDENTIFICAÇÃO DO TIPO DE HPV (16 ou 18) ENVOLVIDO

Dos 35 casos adequados para a realização do Nested-PCR, 16 casos (45,7%) mostraram amplificação para o HPV 16, conforme ilustrado na tabela 4.

Tabela 4: Percentuais encontrados para os tipos de HPV nas lesões.

Grupo	n	Percentual
HPV 16 *	16	45,7
HPV 18 *	08	22,9
HPV 16 e 18*	02	5,7
Negativo	09	25,7
	35	100

* Percentual de positividade total foi de 74,3% (IC 95%: 56,7 a 87,5)

Com relação à identificação dos tipos de HPV presentes, Ishikawa *et al.*, (2003) encontraram uma frequência diferente da que foi encontrada neste estudo, tendo sido de 32,7% (16 casos) para o HPV 16, 26,5% (13 casos) para o HPV 18, e 3 casos foram positivos para ambos.

Neste estudo não foi realizado tipagem viral para outros tipos de HPV's, como fizeram Anderson *et al.*, (2003), tendo encontrado 45% de positividade para HPV 16, 41% para HPV 18, 11% para o HPV 45 e outros 3% restantes consistiam de outros tipos não

conhecidos de HPV. Já no experimento de Tawfik *et al.*, (2006), uma frequência semelhante a deste estudo foi encontrada para o HPV 16, tendo sido de 47%, e, um pouco mais elevada (29%) para o HPV 18.

Os resultados deste estudo mostraram apenas oito casos (22,9%) positivos para HPV 18, o que pode estar em concordância com os resultados encontrados por Anderson *et al.*, (2003), que observaram que o HPV 18 é menos comum que o HPV 16 na população feminina de 32 a 38 anos de idade, diferentemente do que ocorre no adenocarcinoma, o qual apresenta uma prevalência do HPV 18 maior ou igual a do HPV 16 neste tipo de tumor. Podendo estar em concordância com nossos resultados, Chew *et al.*, (2005) encontrou um número significativamente mais alto de DNA-HPV 16 em mulheres com mais de 45 anos de idade com adenocarcinoma cervical.

Outro fator que pode ter sido limitante para um achado discordante de outros estudos em adenocarcinoma com relação aos tipos de HPV encontrados, é o tamanho de nossa amostra ou, talvez, uma maior participação, em nosso meio, de outros tipos de HPVs não identificados em nosso experimento. Com relação a outros tipos de HPV, Castellsagué *et al.*, (2006) também encontraram a associação do HPV 16, 18, além do 59 e 33 com adenocarcinoma, porém, outros tipos foram estatisticamente significantes quando associados com este tipo de neoplasia, como HPV 35, 45, 51 e 58.

Com relação aos tipos de HPV encontrados neste experimento, foi encontrada uma prevalência maior de HPV 16 (45,7%) em relação ao HPV 18 (22,9%) nos adenocarcinomas (figura 22). Algumas pesquisas recentes, conforme já referido anteriormente, também mostraram uma prevalência maior de HPV16 nessas lesões (Munoz *et al.*, 2003; Clifford *et al.*, 2006). Embora o tamanho da amostra deste estudo não tenha

permitido a obtenção de dados estatisticamente significativos, pode-se afirmar que houve uma tendência a um maior número de lesões de adenocarcinoma infectadas com HPV16.

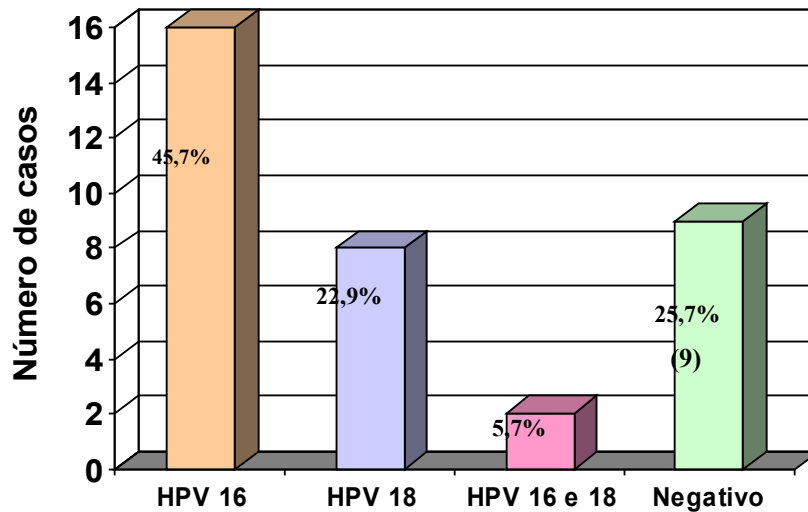


Figura 20: Representação gráfica da distribuição de DNA-HPV 16 e 18 nas lesões.

6.5 RESULTADO DA IHQ PARA P16INK4

A análise da IHQ para p16INK4 foi realizada em 35 amostras por meio do método binário (positivo ou negativo), da identificação da intensidade da coloração obtida (método por escore- +, ++, +++), da porcentagem do número de células coradas e do padrão de coloração do tecido (coloração focal, em áreas ou na totalidade do epitélio glandular).

6.5.1 Método Binário

Das 35 amostras submetidas a IHQ, 25 casos (71,4 %) mostraram a presença da proteína p16INK4 (figura 23).

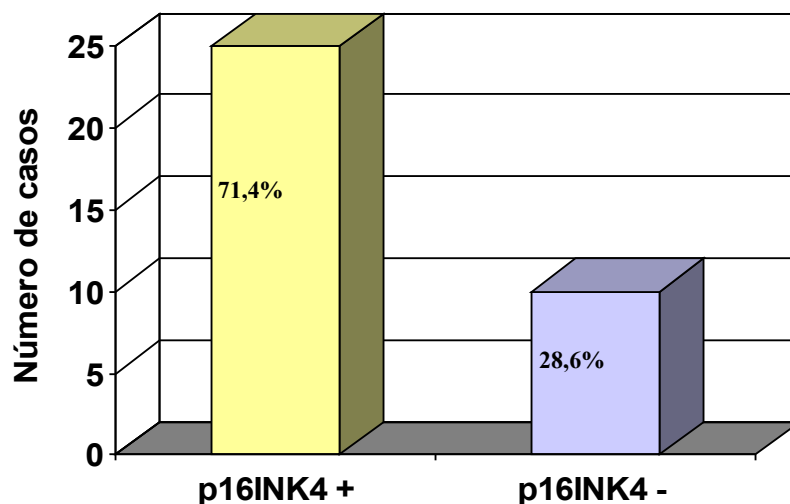


Figura 21: Distribuição dos casos positivos e negativos para p16INK4.

Resultados próximos foram encontrados por Ishikawa *et al.*, (2003), os quais obtiveram positividade da p16INK4 em 74% das amostras de adenocarcinoma, sendo que a frequência de superexpressão da p16INK4 foi similar entre os adenocarcinomas invasivos e as lesões *in situ*. Da mesma forma, frequências semelhantes tanto para os casos invasivos (72%) quanto para os *in situ* (64%) foram observadas em nosso estudo. Schorge *et al.*, (2004), também encontraram um percentual elevado: 85,7% (12 /14) casos de adenocarcinoma invasivo foram positivos para p16INK4.

Neste estudo foi feita uma correlação entre a positividade e a negatividade para p16INK4 e a presença ou ausência de invasão no adenocarcinoma (*in situ* ou invasor), onde não foi encontrada diferença estatisticamente significativa para estes grupos. Entretanto,

tanto nas lesões invasoras quanto nas lesões *in situ*, foi encontrada elevada positividade, o que pode ser explicado pela presença do HPV nestas lesões ocasionando a expressão desta proteína.

A tabela 5 mostra a relação de positividade do p16INK4 e a presença ou ausência de invasão neoplásica.

Tabela 5: Expressão da p16INK4 por IHQ relacionada ao diagnóstico histopatológico utilizando-se o método binário.

Grupo	p16INK4 + (n = 25)	p16INK4 – (n = 10)
Adenocarcinoma <i>in situ</i>	10 (40%)	06 (24%)
Adenocarcinoma invasor	15 (56%)	04 (16%)

Ishikawa *et al.*, (2003) estudaram as frequências de positividade na IHQ para os diferentes tipos histológicos de adenocarcinomas (endocervical, adenoescamoso, endometrióide, intestinal e indiferenciado), não encontrando diferença significativa entre os subtipos histológicos. Esta diferenciação não foi possível neste experimento devido ao fato de não se ter encontrado outros tipos histológicos na avaliação histopatológica.

Com relação aos tipos de HPV encontrados e a positividade para a proteína p16INK4, foram encontradas porcentagens iguais de positividade tanto para o HPV 16 quanto para o HPV 18, 100% de positividade quando estavam presentes HPV 16 e 18 e a

maior porcentagem de positividade para os casos negativos para HPV 16 ou 18, mostrado na tabela 6.

Tabela 6: Correlação entre os tipos de HPV e a presença da proteína p16INK4.

Grupo	n	P16INK4 +		P
		n	%	
HPV 16 +	14	10	71,4	0,99 *
HPV 18 +	07	05	71,4	
HPV 16 E 18 +	01	01	100	
Negativo	09	07	77,8	
	35	23	65,7	

* P exato (*Fisher exact test*)

Em relação à positividade para p16INK4 e os tipos de HPV encontrados, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, o que pode ser explicado pelo tamanho da amostra. O dado de 77,8% dos adenocarcinomas negativos para HPV se apresentarem com positividade para p16INK4 pode sugerir que possam haver outros mecanismos responsáveis pela expressão desta proteína ou que possa haver infecção por outros tipos de HPV não testados no estudo.

6.5.2 Intensidade da Coloração (método de escore)

Nesta etapa, foram atribuídos graus (1+, 2+ ou 3+), conforme a intensidade de coloração visualizada na IHQ (figura 25).

Dos 25 casos positivos (71,4 %) que mostraram a presença da proteína p16INK4, oito casos (32%) mostraram intensidade de coloração 1+, sete casos (28%) intensidade 2+ e dez casos (40%) obtiveram intensidade máxima de coloração 3+ (figura 24).

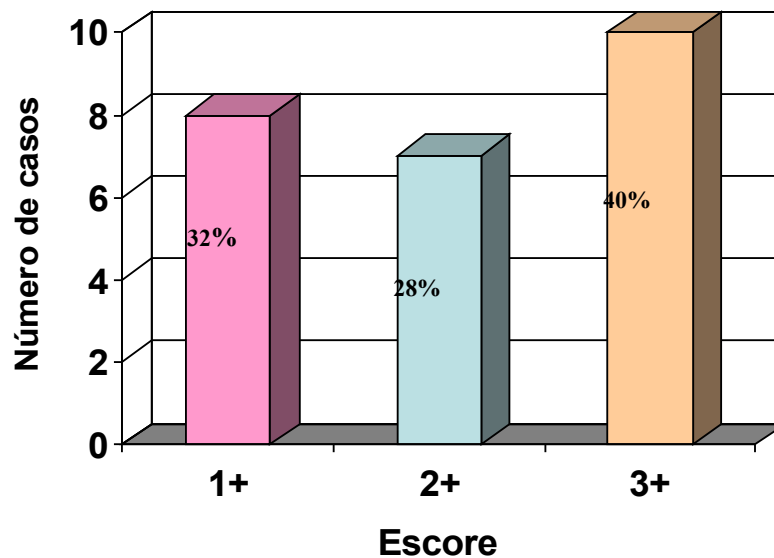


Figura 22: Distribuição da intensidade de coloração (método de escore) entre os casos.

Com relação a presença do HPV e a intensidade de coloração pela IHQ, encontramos uma intensidade de 2+ e 3+ na presença de HPV em 54,6% dos casos, enquanto que nas amostras HPV negativas, 44,4% apresentaram uma intensidade de

coloração de 2+ ou 3+. Comparando somente a forte superexpressão (3+), obtivemos 36,4% para as amostras HPV positivas e 22,2% para as amostras HPV negativas. Devido ao tamanho de nossa amostra, os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Frequências mais altas foram encontradas por Ishikawa *et al.*, (2003), 61,2% de coexistência entre HPV e superexpressão de p16INK4 e 52,9% das amostras HPV negativas mostraram um padrão de superexpressão.

Em nosso experimento, um achado de 2 e 3+ de intensidade de p16INK4 foi encontrado em 44,4% das amostras negativas para HPV, sugerindo que mecanismos independentes do HPV podem contribuir para a superexpressão da p16 nesses tumores. Por outro lado, não podemos excluir a possibilidade de que a sensibilidade técnica da detecção pelo HPV tenha sido um fator limitante ou que existam outros tipos de HPV nas amostras.

A tabela 7 mostra a correlação entre a presença do HPV e a identificação da proteína p16INK4 nas lesões:

Tabela 7: Correlação entre a presença do DNA-HPV e a intensidade de coloração.

Intensidade	DNA-HPV + (n = 21)	DNA-HPV - (n = 09)	P
0	06 (27,3%)	02 (22,2%)	
1+	04 (18,2%)	03 (33,3%)	
2+	04 (18,2%)	02 (22,2%)	0,76 *; 0,69 †
3+	08 (36,4%)	02 (22,2%)	

* Fisher exact test; † Mann-Whitney with exact significance

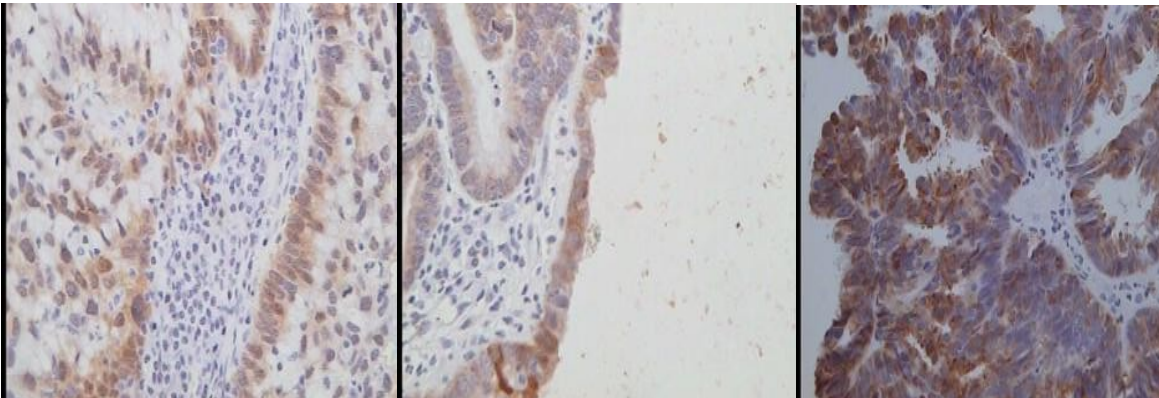


Figura 23: Microscopia óptica de três cortes histológicos demonstrando a graduação de positividade da p16INK4 por escore (1+, 2+ e 3+), respectivamente.

6.5.3 Porcentagem de Células Coradas

Do total de amostras HPV positivo testadas para p16INK4 (21 casos), 14 amostras apresentaram um percentual de coloração de 50% ou mais de células coradas, contra duas amostras apresentando os mesmos percentuais no grupo HPV negativo, testado para p16INK4, resultado estatisticamente significativo (tabela 8).

Tabela 8: Correlação entre a presença do HPV e o percentual de coloração para p16INK4.

Percentual de coloração	DNA-HPV + n = 21	DNA-HPV - n = 09	P
0 a 50%	7 (33,3%)	7 (77,8%)	
Acima de 50%	14 (66,7%)	2 (22,2%)	0,05 †

† *Mann-Whitney with exact significance*

Pode-se observar que as amostras HPV positivas apresentam uma elevada porcentagem de coloração para p16 em relação às amostras HPV negativas, as quais se mostram com menores porcentagens de coloração, fazendo-nos sugerir que talvez a presença do HPV esteja influenciando positivamente a expressão desta proteína (figuras 27 e 28):

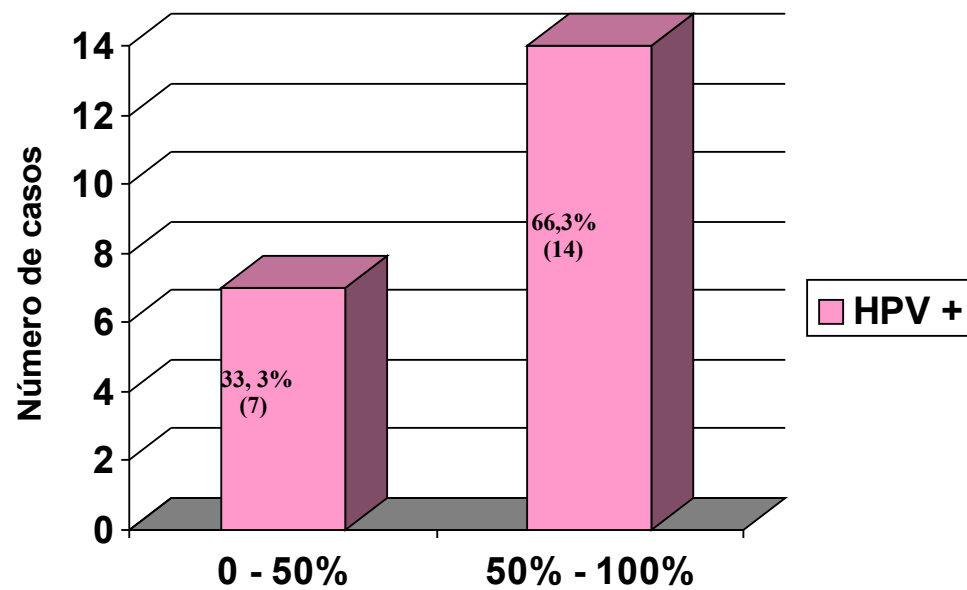


Figura 24: Distribuição das amostras com HPV conforme a IHQ para p16INK4 pelo método de percentual de coloração.

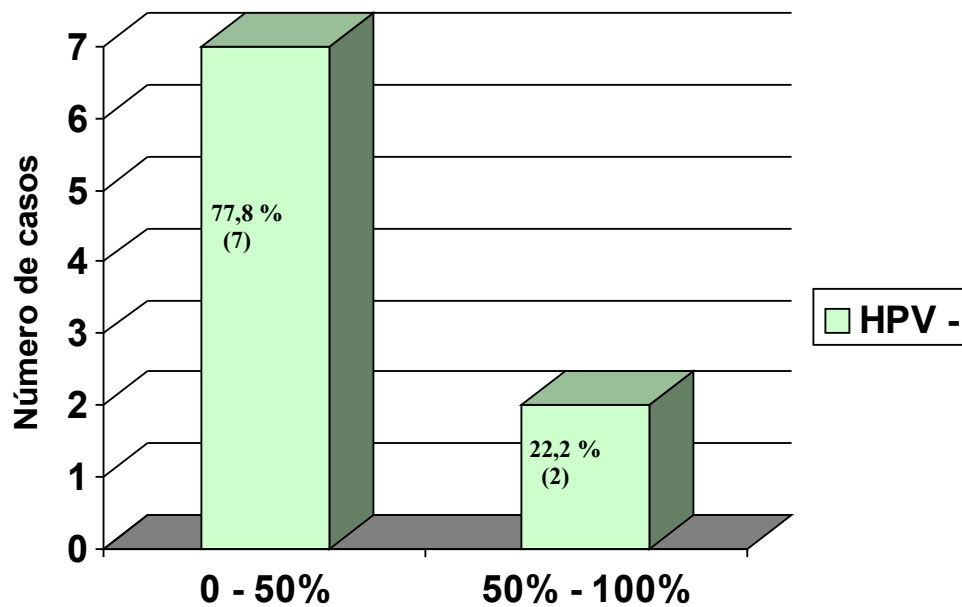


Figura 25: Distribuição das amostras sem HPV conforme a IHQ para p16INK4 pelo método de percentual de coloração.

Conforme Stoler, (2000), uma forte superexpressão indica que a função supressora dos complexos ciclina-CDK podem estar esgotados na presença de oncogenes virais, indicando transformação maligna. Isso pode explicar o elevado percentual de positividade (acima de 50%) para p16INK4 em presença de infecção por HPVs de alto risco neste estudo.

Negri et al., (2003) relata que a p16INK4 é um marcador útil para adenocarcinoma de colo uterino e seus precursores. Em seu estudo, a p16INK4 foi detectada em todos os casos de adenocarcinoma invasivo e *in situ*. Negri mostra que em lesões pré-invasivas a expressão da p16INK4 vai aumentando com o grau de atipia e, ao mesmo tempo, uma elevada porcentagem de positividade foi observada nos epitélios glandulares neoplásicos.

Pode-se sugerir que a presença do HPV pode ocasionar a superexpressão da p16INK4 nas lesões conforme os resultados de elevada positividade nas amostras positivas para HPVs de alto potencial oncogênico nos diferentes métodos de avaliação utilizados (método binário, método de escore e percentual de células coradas). Com relação aos métodos de avaliação da expressão da p16INK4 pode-se evidenciar um certo grau de subjetividade com relação ao método binário e de escore, pois esta avaliação pode variar interobservador. Já o método de porcentagem de células coradas, por ser mais objetivo, pode ser mais fidedigno para avaliação.

6.5.4 Padrão de Coloração

Um padrão de coloração negativo ou focal para a presença da proteína p16INK4 foi identificado em sete amostras (33,3%) das 21 amostras positivas para DNA-HPV. Em 14 amostras (66,7%) identificou-se um padrão de coloração em áreas ou total (figura 29). Nas

amostras negativas (nove amostras) para DNA-HPV, três amostras apresentaram um padrão de coloração em áreas ou total, enquanto que seis amostras (66,7%) mostraram um padrão de coloração negativo ou focal (figura 30). Estes resultados não apresentaram significância estatística, conforme ilustra a tabela 9.

Tabela 9: Correlação entre a presença de DNA-HPV e o padrão de coloração para a proteína p16INK4.

Padrão de coloração	DNA-HPV + n = 21	DNA-HPV- n = 09	P
Negativo ou focal	07 (33,3%)	06 (66,7%)	
Áreas ou total	14 (66,7%)	03 (33,3%)	0,12†

† *Mann-Whitney with exact significance*

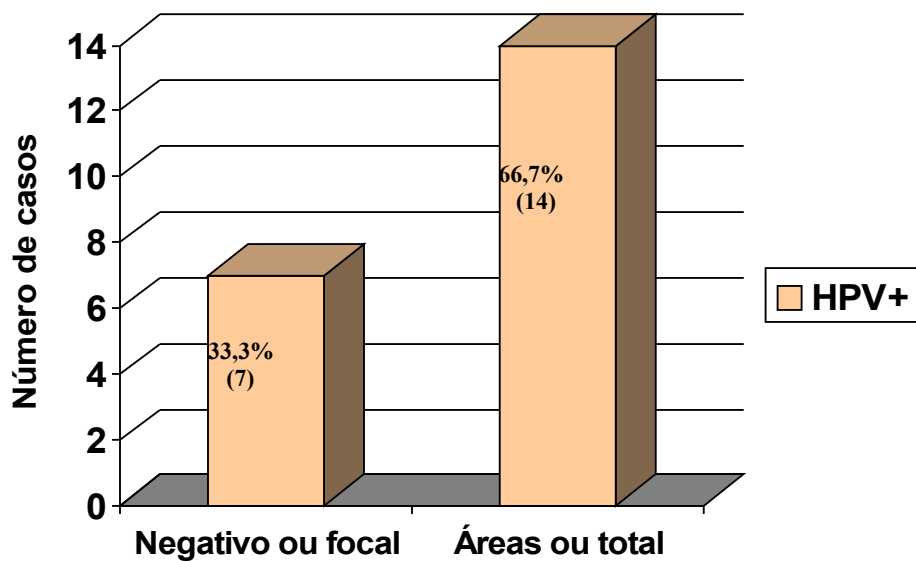


Figura 26: Distribuição das amostras HPV positivo conforme o padrão de coloração.

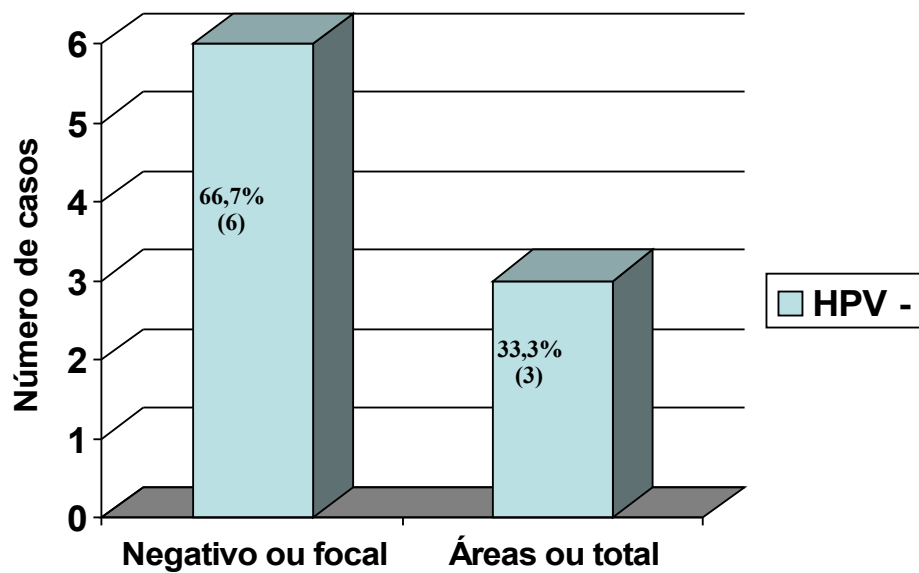


Figura 27: Distribuição das amostras HPV negativo conforme o padrão de coloração.

O padrão de coloração identificado no tecido é de extrema importância na distinção entre lesões reacionais e lesões malignas, tanto *in situ* quanto invasoras. O'Neil et al., (2006) descrevem os achados de glândulas cervicais p16 negativas ou ocasionalmente de positividade fraca focal em glândulas endocervicais normais. Ao contrário, a maioria das lesões glandulares endocervicais pré-malignas ou malignas, em associação com HPVs de alto potencial oncogênico, na sua maioria, exibem uma positividade difusa ou total para a p16INK4. Isso pode ser evidenciado no gráfico 28, mostrando grande parte das amostras HPV positivo com padrão de coloração em áreas ou total na coloração para a p16. Ao contrário das amostras HPV negativo, as quais apresentam, na sua maioria, coloração focal ou negativa para p16INK4 em comparação com as amostras HPV positivo.

O mesmo autor sugere, ainda, que adenocarcinomas cervicais HPV negativo podem exibir uma superexpressão da p16 como um resultado de mecanismos não relacionados a presença do HPV de alto potencial oncogênico.

7. CONCLUSÕES

- ✓ Foi encontrada uma elevada prevalência de DNA-HPV 16 e 18 em amostras de adenocarcinoma [74,3% (IC:56,7 a 87,5) de positividade]. Entretanto, divergindo de alguns outros estudos, os quais apontam uma maior prevalência para o HPV 18 neste tipo de neoplasia, encontramos uma frequência maior de HPV 16 (45,7%), enquanto que a prevalência de HPV 18 em nossa casuística foi de 22,9%.
- ✓ Foi observada elevada porcentagem de amostras positivas na IHQ para p16INK4 (71,4%), percentual semelhante ao encontrado para a presença de DNA-HPV neste estudo. E o método que melhor apresentou correlação entre a presença de DNA-HPV e p16INK4 foi o de percentual de células coradas, onde se pode concluir que, quando o DNA-HPV estava presente, havia um percentual maior de amostras cujas lesões têm 50% ou mais de células coradas, resultado estatisticamente significativo.
- ✓ Não foi encontrada correlação entre os tipos de HPV (16 ou 18), quando analisados separadamente, e a expressão da proteína p16INK4. Paralelamente, um grande percentual de amostras negativas para DNA-HPV 16 e 18 mostraram-se positivas na IHQ, o que pode sugerir que possam haver outros mecanismos relacionados a expressão desta proteína; entretanto, outros tipos de HPV devem ser testados.
- ✓ A realização de um estudo retrospectivo, através de técnicas de biologia molecular, análise de amostras emblocadas em parafina e armazenadas por longo período em laboratório de patologia, requer a utilização de técnicas com elevada sensibilidade devido a degradação do material genético a ser estudado.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Identificar a presença de outros tipos de HPV em adenocarcinomas de colo uterino em nosso meio;
- Tentar identificar outros mecanismos envolvidos na carcinogênese de adenocarcinomas de colo de útero.

9. BIBLIOGRAFIA

Agoff, S. N., Lin, P., Morihara, J. *et al.*, (2003): p16INK4 A Expression Correlates with Degree of Cervical Neoplasia: A Comparison with Ki-67 Expression and Detection of High-Risk HPV types. **Mod Pathol**, 16(7): 665-673.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J. *et al.*, (1997): O Ciclo de Divisão Celular
In: **Biologia Molecular da Célula**, 3ª edição, Porto Alegre, pág. 864 – 906.

Andersson, S. *et al.*, (2003): Adenocarcinoma of the uterine cervix: the presence of human papillomavirus and the method of detection. **Acta Obstetric Gynecology Scandinavian**, 82: 960-965.

Anschau, F., *et al.*, (2005): Association of codon 72 polymorphism with premalignant and malignant cervical lesions. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, 27: 1-8.

Baseman, J. G. & Koutsky, L. A., (2005): The epidemiology of human papillomavirus infecions. **Journal of Clinical Virology**. 32S: S16-S24.

Bosch, F. X., *et al.*, (2002): The Causal Relation Between Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Journal of Clinical Pathology**. 55: 244-265.

Bosch, F. X. & Sanjose, S., (2003): Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer- burden and assessment of causality. **J Natl Cancer Inst Monogr**. 31: 3-13.

Candeias, J. A .N. E Racz, M. L. In: Alterthum, F.: **Microbiologia**, Atheneu, 3^a edição, Rio de Janeiro, 1999.

Castellsagué, X., *et al.*, (2006): Worldwide Human Papillomavirus Etiology of Cervical Adenocarcinoma and Its Cofactors: Implications for Screening and Prevention. **Journal of the National Cancer Institute**, 98(5): 303-315.

Chen, S. L. *et al.*, (1993): Identification and typing of human papillomavirus in cervical cancers in Taiwan. **Cancer**, 72: 1939-1945.

Chew, G. K., *et al.*, (2005): Human papillomavirus 16 infection in adenocarcinoma of the cervix. **British Journal of Cancer**, 93: 1301-1304.

Clifford, G., Franceschi, S., Diaz, M., *et al.*, (2006): HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. **Vaccine**. 24S3: S3/26-S3/34.

Cooper, M., Li, S., Bhardway, T., Rohan, T. *et al.*, (2004): Evaluation of Oligonucleotide Arrays for Sequencing of the p53 Gene in DNA from Formaline-Fixed Paraffin-Embedded Breast Cancer Specimens. **Clinical Chemistry**, 50: 500-508.

Cross, S. S., Start, R. D. & Smith, J. H. (1990): Does Delay in Fixation Affect the Number of Mitotic Figures in Processed Tissue? **J Clin Pathol**, 43: 597-599.

De Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R. *et al.*, (2004): Classification of Papilloma viruses. **Virology**, 324 (1): 17-27.

Diaz-Cano, S. J. & Brady, S. P. (1997): DNA Extraction From Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues: Protein Digestion as a Limiting Step for Retrieval of High-Quality DNA. **Diag Mol Pathol** 6: 342-346.

Di Loreto, C. E Alves, V.A. F. (1998): Patologia das Lesões Relacionadas ao HPV no Trato Anogenital. . In: Bibbo, M. e Moraes Filho, A.: **Lesões Relacionadas à Infecção por HPV no Trato Anogenital**, Revinter, 1ª edição, cap. 7, Rio de Janeiro.

Dong, S.M., Kim, H., Rha, S. , *et al.*, (2001): Promoter Hypermethylation of Multiple Genes in Carcinoma of the Uterine Cervix. **Clinical Cancer Research**, 7: 1982-1986.

Falls, R. K. (1999): Spontaneous resolution rate of grade 1 cervical intraepithelial neoplasia in a private practice population. **American Journal Obstetric Gynecologic**, 181(2): 278-282.

Ferreira, C. G. & Rocha, J. C. (2004): *Oncologia Molecular*, Atheneu, São Paulo, 1ª edição.

Filho, A. L. E Alves, V. A. F. (1998): Reação de Polimerização em Cadeia. . In: Bibbo, M. e Moraes Filho, A.: **Lesões Relacionadas à Infecção por HPV no Trato Anogenital**, Revinter, 1ª edição, cap. 3, Rio de Janeiro.

Giarré, M., Caldeira, S., Malanchi, I. *et al.*, (2001): Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a – imposed G1 cell cycle arrest. **J Virol**, 75 (10) 4705-4725.

Gravitt, P. E., Peyton, C. L., Alessi, T. Q. *et al.*, (2000): Improved amplification of genital human papillomavirus. **J Clin Microbiol**, 38: 357-361.

Herrero, R. *et al.*, (2000): Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. **J Natl Cancer Inst.** 92 (6): 464-474.

Howley, P.M. *et al.*, (2001): Papillomavirinae and their Replication, In: Fields, B.n., Knipe, D.M., (ed): **Field's Virology**, New York, Raven Press.

http://screening.iarc.fr/atlascyto_detail.php?flag=0&lang=4&Id=cyt14644&cat=F2c

http://screening.iarc.fr/atlashisto_detail.php?

[flag=0&lang=4&Id=00002289&cat=F2c1](http://screening.iarc.fr/atlashisto_detail.php?flag=0&lang=4&Id=00002289&cat=F2c1)

Huschtscha, L.I. E Reddel, R.R. (1999): p16INK4 and the control of the cellular proliferative life span. **Carcinogenesis**, 20 (6): 921-926.

Instituto Nacional Do Câncer – INCA. **Câncer do Colo do Útero**. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2006>

Ishikawa, M. *et al.*, (2003): Correlation of p16INK4A Overexpression with Human Papillomavirus Infection in Cervical Adenocarcinomas. **International Journal of Gynecological Pathology**, 22: 378-385.

Keating, J. T., Cviko, A., Riethdorf, S. *et al.*, (2001): Ki-67, Cyclin E and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for Human Papilloma virus-related cervical neoplasia. **Am J Surg Pathol**, 25(7): 884-891.

Klaes, L., Friedrich, T., Spitkovsky, D. *et al.*, (2001): Overexpression of p16INK4 as a Specific Marker for Dysplastic and Neoplastic Epithelial Cells of the Cervix Uteri, **Int J Cancer**, 92: 276-284.

Kristiansen, E., *et al.*, (1994): Human papillomavirus infection in Norwegian women with cervical cancer. **APMIS**, 102: 122-128.

Kubo, A ., Nakagawa, K., *et al.*, (1999): The p16 Status os Tumor Cell Lines Identifies Small Molecule Inhibitors Specific for Cyclin-dependente Kinase 4. **Clin Cancer Reser**, 5: 4279 – 4286.

Kumar, V., Abbas, A. K. & Fausto, N. (2005): **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**, Elsevier, 7ª. Ed., Rio de Janeiro, Cap 7, pág. 281-356.

Kurman, R. J., et al (1992) Tumors of Cervix. In: Kurman, Rj, Norris, H.J. E Wilkinson, E.: **Atlas of Tumor Pathology – Tumors of the Cervix, Vagina, and Vulva**, AFIP, Washington, EUA, 77-95.

Madeleine, M. M., *et al.*, (2001): Human Papillomavirus and Long-ter Oral Contraceptive Use Inceze the Risk os Adenocarcinoma is Situ of the Cervix. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, 10: 171-177.

Maiyer, R. C. & Norris H. J. (1980): Coexistence of cervical intraepithelial neoplasia with primary adenocarcinoma of the endocervix. **Obstet Gynecol**, 56: 361-364.

Miranda, D., Paulino Júnior, E., Castro, L. P. F. *et al.*,(2000) Sistema Genital Feminino. In: Brasileiro Filho, G. (ed.) **Patologia**. Guanabara Koogan, 6ª ed., cap. 17, Rio de Janeiro.

Munger, K. & Howley, P. M., (2002): Human Papillomavirus immortalization and transformation functions. **Virus Res**. 89: 213-228.

Munoz, N., Bosch, F. X., De Sanjose, S., Herrero, R., Castellsalgué, X., Shah, K. V., (2003): Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **New England Journal of Medicine**. 348(6): 518-527.

Murphy, N., Ring, M., Killalea, A. G. *et al.*, (2003): p16^{INK4} as a Marker for Cervical Dyscaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep™ Smers. **Journal of Clinical Pathology**, 56: 56 – 63.

Negri, G. *et al.*, (2003): p16^{INK4A} is a Useful Marker for the Diagnosis of Adenocarcinoma of the Cervix Uteri and Its Precursors. **The American Journal of Surgical Pathology**, 27(2): 187-193.

O' Neill, C. J. *et al.*, (2006): p16 Expression in the Female Genital Tract and Its Value in Diagnosis. **Advanced Anatom Pathology**, 13:8-15.

Papanicolaou, G. N. (1942): New Procedure for Staining Vaginal Smers. **Science**, 95: 438 – 439.

Pirog, E. C., *et al.*, (2000): Prevalence of Human Papillomavirus DNA in Different Histological Subtypes of Cervical Adenocarcinomas. **The American Journal of Pathology**, 157: 1055 – 1062.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., *et al.*, (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 239 (4839): 487-491.

Sano, T., Oyama, T., Kashiwabara, K., Fukuda, T., Nakajima, T.: (1998) Expression Status of p16 Protein is Associated with Human Papillomavirus Oncogenic Potencial in Cervical and Genital Lesions. **Am J Pathol**, 153: 1741-1748.

Schorge, J. O., *et al.* (2004): p16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 190: 668-673.

Sedlacek, T. V. (1999): Advances in the diagnosis and treatment of human papillomavirus infections. **Clinical Obstetric Gynecology**, 42 (2): 206-220.

Serth, J., Kuczyk, M. A., Paeslack, U. *et al.*, (2000): Quantitation of DNA Extracted after Micropreparation of Cells from Frozen and Formalin-Fixed tissue Sections. **Am J Pathol**, 156: 1189-1196.

Silva, T. T. (2006): Identification of papillomavirus types and other risk factors for cervical intraepithelial neoplasia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, 28: 1- 10.

Srinivasan, M. Sedmak, D. & Jewell, S. (2002): Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. **Am J Pathol**, 161: 1961-1971.

Stoler, M. H. (2000): Human papillomavirus and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis. **Int Journal Gynecology Pathology**, 19: 16-28.

Stoler, M. H. (1996): A brief synopsis of the role of human papillomaviruses in cervical carcinogenesis. **Am J Obst Gynecol**, 175(4): 1091-1098.

Taylor, C. R., Shio, S., Barr, N. J. *et al.*, (2002): Techniques of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls and Standardization. In: Dabbs, J.D.: **Diagnostic Immunohistochemistry**, Churchill Livingstone, Philadelphia, cap.1, pag. 3 – 44.

Tawfik El-Amnsi, M. *et al.*, (2006): Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical adenocarcinoma and its precursors in Scottish patients. **Int J Gynecol Cancer**, (16): 1025-1031.

Tsai, H. J. *et al.*, (2005): A association between human papillomavirus 16/18 deoxyribonucleic acid in peripheral blood with p16 protein expression in neoplastic cervical lesions. **Cancer Detection and Prevention**, (29): 537-543.

Unger, E. R., Vernon, S. D., Lee, D. R., *et al.*, (1998): Detection of human Papillomavirus in Archival Tissues: Comparison of in Situ Hybridization and Polymerase Chain Reaction. **J Histochem Cytochem**, 46: 535-540.

Villa, L. L: Aspectos Moleculares da Oncogênese por papilomavírus. In: Bibbo, M. e Moraes Filho, A.: **Lesões Relacionadas à Infecção por HPV no Trato Anogenital**, Revinter, 1ª edição, cap. 4, Rio de Janeiro, 1998.

Yagi, N., Satonaka, K., Horio, M. *et al.*, (1996): The Role of Dnase and EDTA on DNA degradation in formaldehyde fixed tissues. **Biotech Histochem**, 71: 123-129.

Wang, J. Zheng, B., Li, X., *et al.* (2004): Predictive Significance of the Alterations of p16INK4, p14ARF, p53 and Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in the Progression of Cervical Cancer. **Molecular Oncology**, 10: 2407-2414.

Wieland, U. E Pfister, H.: Infecção por Papilomavírus em Patologia Humana: epidemiologia, patogênese e papel oncogênico. In: Gross, G.E. e Barrasso, R.: **Papilomavírus Humano – Atlas Clínico de HPV**. ArtMed, 1ª edição, cap. 1, Porto Alegre, 1999.

Winer, R. L. (2006): Condom Use and the Risk of Genital Human Papillomavirus Infection in Young Women. **The New England Journal of Medicine**. 334(25): 2645-2650.

Wright, T. C.; Kurman, R. J. & Ferenczy, A. (1994): Precancerous Lesions of the Cervix. In: Kurman, R.J.: **Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract**, Springer-Verlag, 4ª edição, New York, pag. 229 – 278.

[www.cytopathology.org / NIH /view.php?patientId=99](http://www.cytopathology.org/NIH/view.php?patientId=99)

Zahm, D. M. E Schneider, N. A.: Princípios Gerais do Diagnóstico: detecção do papilomavírus humano. In: Gross, G.E. e Barrasso, R.: **Papilomavírus Humano – Atlas Clínico de HPV**. ArtMed, 1ª edição, cap. 2, Porto Alegre, 1999.

Zielinsk, G. D. *et al.*, (2003): The presence of high-risk HPV combined with specific p53 and p16INK4a expression patterns points to high-risk HPV as the main causative agent for adenocarcinoma in situ and adenocarcinoma of the cervix. **J Pathol.** 201: 535-543.

ANEXO 1

Ao Comitê de Ética em Pesquisa

Assunto: Dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido.

Prezado Sr.

O Laboratório de Patologia do DCBM, está elaborando o projeto intitulado “*Identificação de DNA-HPV 16 e 18 e da expressão de p16INK4 em adenocarcinomas de colo uterino*”, o qual tem como objetivo o estudo de vírus HPV e da proteína p16INK4 em amostras de pacientes portadoras de adenocarcinoma de colo de útero.

Para realização da pesquisa, é necessário que se realize a avaliação do material embocado de biópsias de colo uterino previamente realizadas para fins diagnósticos e armazenadas no laboratório de patologia. Estas amostras serão analisadas no laboratório de biologia molecular localizado no bloco S da UCS. Para tanto, solicito dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido e que este seja substituído pelo termo de compromisso de confidencialidade, nos termos que seguem.

As responsabilidades dos pesquisadores são manter o sigilo com relação ao diagnóstico das pacientes. Somente os profissionais envolvidos diretamente com a pesquisa é que saberão do diagnóstico e do resultado de nossas pesquisas, os quais não influenciarão no tratamento ou acompanhamento médico. A privacidade das pacientes será resguardada. O nome das pacientes não será referido nesta pesquisa. Caso nosso estudo demonstre a presença do HPV ou a expressão da proteína p16INK4, a equipe médica que acompanha a

paciente não será informada, pois estes dados não terão influência sobre o tratamento ou acompanhamento das mesmas.

As amostras não serão utilizadas para outras pesquisas que não as referidas neste protocolo, e após o término deste estudo, permanecerão guardadas em arquivos no laboratório de patologia.

Em necessidade de contato com o laboratório de patologia para esclarecimentos, falar com Carla Flores Braga, das 14h às 18h diariamente, pelo fone: 32182100 ramal 2541. O laboratório onde será realizada a pesquisa, está localizado na cidade universitária da UCS, bloco S, sala 501.

Pesquisador

Caxias do Sul, 2006.

ANEXO 2

REGISTRO DE CASOS DE ADENOCARCINOMA

Número do exame:.....

Histologia:

Adenocarcinoma *in situ*

Adenocarcinoma invasor

Associado à lesão escamosa

HPV:

Resultado do PCR: Negativo

Positivo - Tipagem Viral:

Proteína p16:

Negativo

Positivo

Intensidade de coloração:

+ ++ +++

Porcentagem de células coradas:

< 25% 25% 50% < 75% > 75%

Distribuição da coloração:

Focal Áreas Total

ANEXO 3

TABELA DE DADOS

caso	p16	intens	%	padrão	escam	grau inv	hpv	hpv16	hpv18	
1	positivo	3	4	3	não	invasor	positivo	positivo	negativo	
2	positivo	1	1	1	não	invasor	positivo	positivo	negativo	P16 – Imuno-histoquímica para p16INK4
3	positivo	1	1	1	sim	in situ	positivo	negativo	positivo	
4	negativo	0	0	0	sim	in situ	positivo	positivo	negativo	
5	positivo	2	1	1	não	invasor	negativo	-	-	Intens – Intensidade de coloração
6	negativo	0	0	0	não	invasor	positivo	negativo	positivo	
7	0 - Ausência de células coradas
8	negativo	0	0	0	não	invasor	positivo	positivo	negativo	1 - número mínimo de células coradas
9	positivo	2	4	2	não	invasor	positivo	negativo	positivo	2 - número moderado de células coradas
10	positivo	1	1	1	sim	invasor	negativo	-	-	3 - número acentuado de células coradas
11	negativo	0	0	0	não	invasor	positivo	negativo	positivo	3 - número acentuado de células coradas
12	negativo	0			não	invasor	positivo	positivo	negativo	3 - número acentuado de células coradas
13	positivo	3	3	2	não	in situ	positivo	positivo	negativo	
14	negativo	0	0	0	não	in situ	negativo	-	-	% - Porcentagem de coloração
15	positivo	3	5	3	não	invasor	positivo	negativo	positivo	0 – Ausência de células coradas
16	positivo	3	4	2	não	in situ	negativo	-	-	1 – De 1 a 25% de células coradas
17	positivo	1	2	2	não	in situ	negativo	-	-	2 – 25% de células coradas
18	positivo	3	5	3	não	invasor	negativo	-	-	3 – 50% de células coradas
19	negativo	0	0	0	não	in situ	x	x	x	4 – 75% de células coradas
20	positivo	3	5	3	não	invasor	positivo	positivo	negativo	5 – Mais de 75% de células coradas
21	positivo	2	5	3	não	invasor	x	x	x	
22	Padrão – Padrão de coloração
23	positivo	2	1	1	não	in situ	negativo	-	-	0 – Ausência de células coradas
24							positivo	positivo	positivo	1 - Padrão de coloração focal
25	positivo	1	4	3	não	in situ	positivo	positivo	negativo	2 – Padrão de coloração em áreas
26	positivo	2	4	3	não	in situ	positivo	positivo	negativo	3 – Padrão de coloração total
27	positivo	1	2	2	não	in situ	x	x	x	
28	positivo	3	5	3	não	invasor	positivo	positivo	negativo	Escam – Associação a lesão escamosa
29	negativo	0	0	0	não	in situ	x	x	x	
30	positivo	1	1	1	não	invasor	negativo	-	-	
31	positivo	2	3	2	não	invasor	positivo	negativo	positivo	Grau inv – Grau de invasão
32	positivo	3	5	3	não	invasor	positivo	negativo	positivo	
33	positivo	3	3	2	não	invasor	positivo	positivo	negativo	HPV – <i>Papillomavirus humano</i>
34	negativo	0	0	0	não	invasor	negativo	-	-	
35	X – Não realizado
36	
37 - excluído
38	negativo	0	0	0	sim	in situ	positivo	positivo	negativo	
39	positivo	1	3	2	não	invasor	positivo	positivo	positivo	
40	x	x	x	x	x	x	positivo	positivo	negativo	
41	x	x	x	x	x	x	positivo	positivo	negativo	
42	positivo	3	3	2	não	in situ	positivo	positivo	negativo	
43	positivo	2	4	3	não	in situ	positivo	positivo	negativo	
44	x	x	x	x	x	x	positivo	negativo	positivo	