

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

***EXPRESSÃO DA p16INK4 EM LESÕES  
PRECURSORAS DE BAIXO GRAU DO CARCINOMA  
ESCAMOSO DO COLO UTERINO – ESTUDO PROSPECTIVO  
DE SEGUIMENTO***

**ALESSANDRA EIFLER GUERRA GODOY**

CAXIAS DO SUL, 2010.

**ALESSANDRA EIFLER GUERRA GODOY**

**EXPRESSÃO DA p16/INK4 EM LESÕES PRECURSORAS DE  
BAIXO GRAU DO CARCINOMA ESCAMOSO DO COLO  
UTERINO – ESTUDO PROSPECTIVO DE SEGUIMENTO**

“Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de  
Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia”

**ORIENTADOR:  
PROF. DR.FABIO F. PASQUALOTTO**

**CO-ORIENTADORA:  
DR<sup>a</sup>. JOVANA MANDELLI**

**CAXIAS DO SUL, 2010**

**ALESSANDRA EIFLER GUERRA GODOY**

**EXPRESSÃO DA p16/INK4 EM LESÕES PRECURSORAS DE  
BAIXO GRAU DO CARCINOMA ESCAMOSO DO COLO  
UTERINO – ESTUDO PROSPECTIVO DE SEGUIMENTO**

“Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de  
Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia”

TESE APROVADA EM VINTE E TRÊS DE JUNHO DE DOIS MIL E DEZ.

**ORIENTADOR:  
PROF. DR.FABIO F. PASQUALOTTO**

**CO-ORIENTADORA:  
DR<sup>a</sup>. JOVANA MANDELLI**

**PROF. DR. RENATO LUIZ ROMBALDI**

**PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> LUISE MEURER**

**PROF.DR.JOÃO ANTONIO PEGAS HENRIQUES**

## AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Fabio F. Pasqualotto pelo constante incentivo, sempre indicando a direção a ser tomada.

A co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Jovana Mandelli pelo incentivo e constante disposição em ajudar, desde os pequenos detalhes até os grandes questionamentos.

Aos Drs. Eduardo Pretto Serafini e Celso Piccoli Coelho pela ajuda, incentivo e presença em absolutamente todos os momentos.

Aos médicos colaboradores, sem os quais o desenvolvimento clínico não seria possível.

A colega patologista Francine Hehn de Oliveira pelo precioso auxílio no desenvolvimento do banco de dados.

As alunas Cintia Zaffonato, Luzia Lucena e Viviane Vedana pela constante dedicação e precioso auxílio que prestaram, nas mais diversas fases de desenvolvimento deste projeto.

As colegas Nilza Losquiavo, Edinéia Zimmermann e Kamille Losquiavo pelo incansável apoio e auxílio.

Ao Prof. Dr. Mario Wagner pelo auxílio na definição da metodologia estatística.

A toda minha família, em especial ao meu marido, Humberto Tomazi Godoy e aos meus filhos, Betina, Manoela e Lorenzo, por me darem o privilégio de ter estas fontes inesgotáveis de inspiração.

# ÍNDICE

## RESUMO

## ABSTRACT

## INTRODUÇÃO

<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>14</b>
1.1 O CÂNCER DO COLO UTERINO	14
1.2 LESÕES PRE-MALIGNAS	15
1.3 O HPV E O CÂNCER DO COLO UTERINO	26
1.4 O VÍRUS	29
1.5 O GENOMA VIRAL E OS ONCOGENES	30
1.6 A PROTEÍNA p16/ <i>INK4</i> E O CICLO CELULAR	33
1.7 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA INFECÇÃO PELO HPV E DAS LESÕES RELACIONADAS AO VÍRUS	39
1.7.1 CITOPATOLOGIA	40
1.7.2 HISTOPATOLOGIA	43
1.7.3 COLPOSCOPIA	44
1.7.4 IMUNOHISTOQUÍMICA	45
1.7.5 HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR	47
1.7.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	48
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>51</b>
2.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	51
2.2 CITOPATOLOGIA	52
2.3 COLPOSCOPIA	52
2.4 ANATOMIA-PATOLÓGICA	53
2.5 BIOLOGIA MOLECULAR	53
2.6 IMUNOHISTOQUÍMICA	58
2.7 ESTATÍSTICA	59

<b>3. RESULTADOS</b>	<b>60</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b>	<b>69</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>73</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>74</b>
<b>7. ANEXOS</b>	
7.1 ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO E ESCLARECIDO	84
7.2 ANEXO 2: 1º ARTIGO (SOBRE O MÉTODO UTILIZADO)	86
7.3 ANEXO 3: DOCUMENTAÇÃO REFERENTE A PATENTE COM ATRIBUIÇÃO DE NÚMERO, RELACIONADA AO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA p16/INK4	101

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação das pacientes incluídas no estudo, com respectivos testes realizados.	61
Tabela 2: Resultados da pesquisa de DNA-HPV por biologia molecular.	63
Tabela 3: Lista de pacientes com infecção múltipla pelo HPV.	64
Tabela 4: HPV's mais encontrados e respectivos percentuais	66
Tabela 5: Distribuição dos casos corados pela p16 $INK4$ relacionados ao percentual de células coradas.	67
Tabela 6: Correlação entre a expressão de p16 $INK4$ e a presença de DNA-HPV por PCR.	67
Tabela 7: Associação entre os tipos de HPV e a expressão da proteína p16 $INK4$ .	68

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Equivalências entre as classificações e nomenclaturas utilizadas na histologia e citologia das lesões precursoras e invasivas do colo uterino.	25
Quadro 2: <i>Primers</i> utilizados no PCR “nested”	57

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1: Comparação entre uma célula superficial normal (à esquerda) e uma célula intermediária (seta) com núcleo aumentado e irregularidade nuclear (400x, coloração de Papanicolaou, acervo pessoal). 19
- Fig.2: Presença de dois coilócitos, um deles binucleado, no centro da foto (100x, coloração de Papanicolaou, acervo pessoal). 19
- Fig.3: Célula binucleada no centro (seta), célula com macronucleose e irregularidade nuclear à direita e abaixo (1000x, Papanicolaou, acervo pessoal). 20
- Fig.4: A e B) grupos de células mostrando intensa hipercromasia, indentações nucleares e inversão da relação núcleo citoplasma (seta) (1000x e 400x, coloração de Papanicolaou, acervo pessoal). 21
- Fig. 5: Características histológicas arquiteturais das NIC 1, NIC 2 e NIC 3, comparadas com epitélio normal (modificada de Kumar *et al.*,2005). 24
- Fig. 6: Co-fatores na carcinogênese do colo uterino. 28
- Fig. 7: Representação esquemática do genoma do HPV 16 mostrando os genes da região inicial (E1 a E7), da região tardia (L1 e L2) e da região regulatória (LCR). 31
- Fig. 8: Ciclo celular (Kumar *et al.*, 2005) 35
- Fig.9: Estratégias em métodos diagnósticos relacionados as lesões e a infecção pelo HPV. 40
- Fig. 10: A: aplicação do anticorpo primário; B: aplicação do polímero enzimático. 47

## NOMENCLATURA

CDC - *Center for Disease Control and Prevention* (USA)

CDK - quinases dependentes de ciclina

CIS - carcinoma “*in situ*”

DNA - ácido desoxiribonucleico

DST - doença sexualmente transmissível

E2F - fator de alongação 2

HE - hematoxilina-eosina

HPV - vírus do papiloma humano

INCA - Instituto Nacional do Câncer

JEC - junção escamo-colunar

LEIAG- lesão escamosa intraepitelial de alto grau

LEIBG- lesão escamosa intraepitelial de baixo grau

NIC - neoplasia intraepitelial cervical

PAP - teste de Papanicolaou

PCR - reação em cadeia da polimerase

pRb - proteína do retinoblastoma

RNA - ácido ribonucléico

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

## RESUMO

O carcinoma escamoso do colo uterino é uma das neoplasias de maior incidência em todo o mundo, inclusive no Brasil, sendo responsável pela morte de milhares de mulheres a cada ano, grande parte delas ocorrendo em plena idade produtiva.

Ao longo dos últimos cinquenta anos, diversos pesquisadores têm estudado esta neoplasia. Sabe-se que a fase invasora do carcinoma escamoso do colo uterino é precedida por uma fase intra-epitelial, precursora (neoplasias intra-epiteliais cervicais/ NICs). As lesões precursoras podem ser divididas em dois grandes grupos: as de baixo grau e as de alto grau (Sistema de Bethesda). Se por um lado, o percentual de lesões de alto grau que evoluem para carcinoma escamoso invasor é grande, por outro lado, somente uma pequena parcela de mulheres que têm lesões precursoras de baixo grau vai desenvolver uma lesão invasora. Entretanto, ainda não somos capazes de identificar entre estas mulheres, quais são as que irão progredir para carcinoma escamoso do colo uterino.

O presente estudo procurou avaliar a expressão da p16<sup>INK4</sup> em pacientes com lesão de baixo grau do colo uterino, correlacionando com a presença de HPV-DNA e sua evolução ao longo do tempo.

O estudo acompanhou 118 pacientes por um período máximo de 33 meses, examinando-as com intervalos de 6 meses. A conclusão foi que a p16<sup>INK4</sup> se relacionada positivamente com infecção múltipla por HPV e que nestas pacientes a expressão da mesma chega a 100% de células neoplásicas coradas. Algumas pacientes evoluíram para lesão de alto em um período curto de tempo (alguns meses).

## ABSTRACT

The squamous carcinoma of the cervix uterine is one of the neoplasias of bigger incidence in the whole world, also in Brazil, being responsible for the death of thousand of women to each year, great part of them occurring in full productive age. Throughout last the fifty years, diverse researchers have studied this neoplasia. We know that the invading phase of the squamous carcinoma of the cervix uterine is preceded by an intra-epithelial phase, precursory (cervical intraepithelial neoplasia - CIN). The precursory injuries can be divided in two great groups: of low degree and of high degree (Bethesda System). If on the other hand, the percentage of injuries of high degree that evolve for invading squamous carcinoma is great, on the other hand, a small parcel of women whom they have precursory injuries of low degree only goes to develop an invading injury. However, not yet we are capable to identify between these women, which are the ones that will go to progress for squamous carcinoma of the cervix uterine. The present study it looked for to evaluate the expression of p16<sup>INK4</sup> in patients with injury of low degree of the uterine col, correlating with the presence of HPV-DNA and its evolution throughout the time. The study it folloied 118 patients for a maximum period of 33 months, examining them with intervals of 6 months. The conclusion was that p16<sup>INK4</sup> if related positively with multiple infection for HPV and that in these patients the expression of the same one arrives the 100% of neoplastic cells stained. Some patients developed high lesion in a short period of time (several months).

## INTRODUÇÃO

O câncer do colo uterino é uma das neoplasias de maior incidência em todo o mundo, inclusive no Brasil, sendo responsável por milhares de mortes a cada ano, grande parte delas ocorrendo em mulheres em plena idade produtiva. Ao longo dos últimos cinqüenta anos, diversos pesquisadores têm estudado esta neoplasia, chegando ao ponto de tornar-se uma das mais bem conhecidas. Sabe-se, até o momento, que a fase invasora do carcinoma do colo uterino é precedida por uma fase intra-epitelial, caracterizada como “lesões precursoras” ou “pré-malignas”. Sabe-se, também, que nem todas as mulheres que desenvolvem estas “lesões precursoras” irão evoluir para carcinoma invasor. Somente uma pequena parcela irá comportar-se desta maneira. Nos últimos anos, tem-se presenciado um esforço muito grande da ciência em tentar identificar, dentre as “lesões precursoras”, as que irão evoluir para a fase invasora do câncer. Entretanto, apesar dos esforços, ainda não foi possível identificar este pequeno grupo.

A *p16INK4* é uma proteína que participa do ciclo celular, estando superexpressa em uma série de neoplasias, inclusive carcinoma do colo uterino e suas lesões precursoras de alto grau. Apesar da *p16INK4* encontrar-se superexpressa em vários casos de lesões precursoras de baixo grau do carcinoma escamoso do colo uterino, esta marcação ocorre maneira irregular, o que leva a pensar que existam subgrupos dentro do conjunto de pessoas que desenvolvem estas lesões precursoras de baixo grau. Sendo assim, o objetivo geral foi

identificar subgrupos dentro do grupo de pessoas que desenvolvem lesão precursora de baixo grau do carcinoma do colo uterino.

## **1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1. O CÂNCER DO COLO UTERINO**

O carcinoma escamoso do colo uterino constitui problema de grande impacto populacional, já que o tumor incide em mulheres jovens, em idade fértil e profissionalmente ativas e ainda predomina, em países como o Brasil, nos quais a realização de controles relacionados com a procura ocasional dos serviços de saúde é determinada por razões diversas que não o rastreamento do câncer do colo do útero. Essa modalidade tem sido designada de rastreamento oportunista, e não tem sido eficiente em reduzir as taxas de incidência e mortalidade do câncer do colo do útero (Zeferino, 2008; Vale, *et al*, 2010). As lesões neoplásicas do colo uterino associam-se a fatores como falta de higiene, promiscuidade e baixo nível sócio-econômico, fatores estes responsáveis pelo aumento da sua incidência em muitos países subdesenvolvidos (Miranda *et al*, 2000; Sankaranarayanan, & Ferlay, 2006).

Há cerca de 50 anos, o câncer do colo uterino representava a primeira causa de morte por neoplasia maligna em mulheres em todo o mundo, o que despertou o interesse de vários grupos de investigadores. Hoje, o carcinoma escamoso do colo uterino é uma das mais bem estudadas e conhecidas entre todas as neoplasias, sendo bem estabelecidos fatores de risco e lesões precursoras cujo diagnóstico pode ser feito precocemente, diminuindo a morbidade e mortalidade e aumentando a taxa de cura (Miranda *et al*, 2000).

No mundo todo, o carcinoma de colo uterino ocupa o segundo lugar, perdendo apenas para as neoplasias de pele. O diagnóstico precoce das lesões precursoras do carcinoma do colo uterino bem como seu tratamento, faz com que haja uma diminuição de incidência de neoplasias invasoras. O colo uterino é um dos órgãos mais estudados do corpo humano não só pela alta incidência de neoplasias, mas também pela relativa facilidade de acesso dos meios de investigação. (Rivoire *et al*, 1993; Eluf Neto, 1998; O'Shaughnessy *et al.*, 2002; Sankaranarayanan, & Ferlay, 2006).

No Brasil, o câncer de colo uterino ocupa o primeiro lugar entre as neoplasias malignas que acometem mulheres. O Rio Grande do Sul é o único estado em que o câncer de colo uterino ocupa o segundo lugar, sendo que a neoplasia maligna mais freqüente é o carcinoma da mama. Isto deve-se, presumivelmente, a um melhor rastreio populacional e a origem étnica da população gaúcha. Estima-se que, mundialmente, duas em cada 100 mulheres terão câncer do colo do útero antes de completarem 80 anos. Cerca de 95% deles poderiam ser curados se tratados precocemente. No entanto, este índice de cura não ultrapassa os 50% e no Brasil certamente é menor. (Rivoire *et al*, 1993; INCA, 2010).

## 1.2 LESÕES PRÉ-MALIGNAS

No início do século XX, a observação das semelhanças morfológicas entre as células do carcinoma de colo uterino francamente invasor e as células de áreas adjacentes ao tumor, ainda confinadas ao epitélio, delimitadas pela membrana basal, representou o marco inicial na identificação de lesões pré-malignas (Miranda *et al*, 2000).

Em 1932, Broders reintroduziu o termo carcinoma “*in situ*” (CIS), o qual foi primeiramente utilizado por Schottlander e Kermauner, referindo-se àquelas lesões nas quais há um grande número de alterações morfológicas restritas ao epitélio, não se

evidenciando ruptura da camada basal (Wright *et al.*, 1994; Miranda *et al.*, 2000). Em 1956, foi introduzido o termo displasia para designar lesões de caráter progressivo dentro de um espectro, tendo em um extremo as células epiteliais normais e, no outro, as do carcinoma “*in situ*” (normal > displasia leve > displasia moderada > displasia severa/carcinoma “*in situ*” > carcinoma invasor). No final da década de 60, Richart introduziu o termo neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) para referir-se ao espectro de alterações intra-epiteliais que se iniciariam com a displasia leve e culminariam com o carcinoma “*in situ*” e, daí, passando a invadir os tecidos, rompendo a camada basal do epitélio (Miranda *et al.*, 2000). Esta relação temporal foi descrita por Smith e Pemberton (Wright *et al.*, 1994).

O termo neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) foi proposto por Richart e Barron em 1968, devido à concepção da natureza progressiva das lesões que levariam ao câncer cervical invasor. O termo neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) representa uma lesão histológica do epitélio cervical (Barron & Richart, 1968; Wright, *et al.*, 1994). É um termo abrangente que engloba todos os precursores do carcinoma escamoso da cérvix uterina (Barrasso & Guillemotonia, 1999). Por definição, é assintomática e identificada mais comumente após a detecção de células disqueratóticas<sup>1</sup> em exame citológico de rotina (Buckley, 1995).

Em dezembro de 1988, um pequeno grupo de especialistas, liderado por Kurman e Solomon, introduziu a nomenclatura conhecida como Sistema de Bethesda para utilização nos relatórios diagnósticos de lesões pré-malignas do colo uterino, na rotina da citopatologia (Kurman, 2004).

---

<sup>1</sup> Células disqueratóticas são comumente observadas em infecção pelo HPV. Mostram-se em grupos tridimensionais, eosinofílicos, com núcleo picnótico (Schneider & Schneider, 1998).

No sistema de Bethesda, lesões intra-epiteliais escamosas compreendem um espectro de anormalidades encontradas e restritas ao epitélio escamoso, associadas ao papilomavírus humano (HPV), as quais representam as lesões precursoras do câncer do colo uterino. No sistema de Bethesda, este espectro está dividido em: lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau (LEIBG) e de alto grau (LEIAG). As LEIBG englobam diversas alterações celulares chamadas de “efeito citopático viral” (coilocitose) e a displasia leve, também chamada de neoplasia intraepitelial cervical 1 (NIC 1), na nomenclatura proposta por Richart. As LEIAG englobam as displasias moderada, severa e o carcinoma “in situ”, ou NIC 2, 3 e carcinoma “in situ” (Wright, 2004).

O diagnóstico de alterações citopáticas virais e displasia leve (LEIBG) obedece aos seguintes critérios (Wright, 2004) (figs.1,2;3):

- presença de células isoladas ou em grupos;
- alterações citológicas confinadas as células superficiais;
- aumento nuclear maior que três vezes a área do núcleo de uma célula intermediária normal;
- vários graus de hiper cromasia, acompanhados de variações na forma e número dos núcleos; presença de binucleação e multinucleação;
- cromatina uniformemente distribuída, por vezes granular;
- nucléolo geralmente ausente;
- bordas citoplasmática distintas;
- presença de coilocitose (cavitação perinuclear);
- presença de orangeofilia.

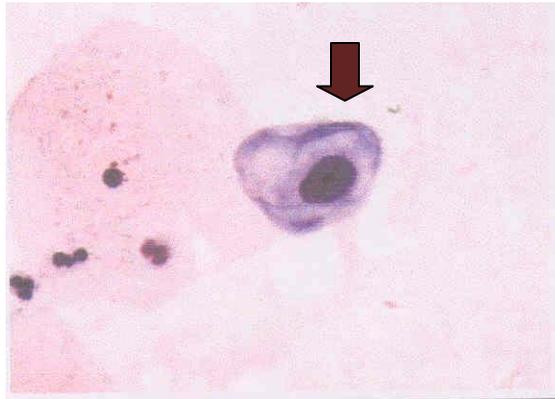


Fig. 1: Comparação entre uma célula superficial normal (à esquerda) e uma célula intermediária (seta) com núcleo aumentado e irregularidade nuclear (400x, coloração de Papanicolaou, acervo pessoal).

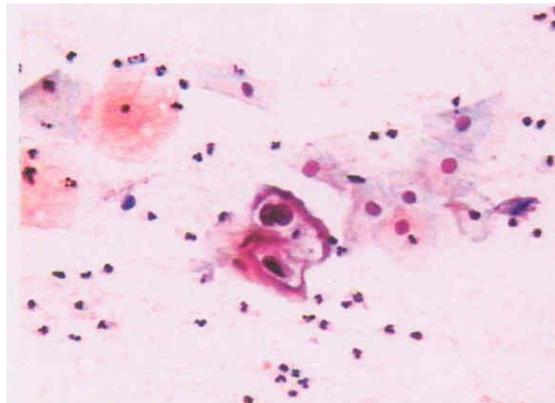


Fig.2: Presença de dois coilócitos, um deles binucleado, no centro da foto (100x, coloração de Papanicolaou, acervo pessoal).



Fig.3: Célula binucleada no centro (seta), célula com macronucleose e irregularidade nuclear à direita e abaixo (1000x, Papanicolaou, acervo pessoal).

Para o diagnóstico de LEIAG (NIC 2, 3 e carcinoma “in situ”) tem-se os seguintes critérios, segundo Wright *et al.* (2004) (fig. 4):

- alterações citológicas afetam células menos maduras que aquelas vistas nas LEIBG;
- as células ocorrem isoladas, em grupos, ou em pequenos agregados de aspecto sincicial;
- hiper cromasia nuclear acompanhada por intensa variação nuclear tanto em forma quanto em tamanho;
- marcado aumento da relação núcleo/citoplasma;
- cromatina grosseira e granular;
- contorno nuclear irregular por vezes formando indentações;

- nucléolo geralmente ausente, mas pode estar presente eventualmente;
- aparência citoplasmática variável , mas pode aparecer com aspecto imaturo e denso.

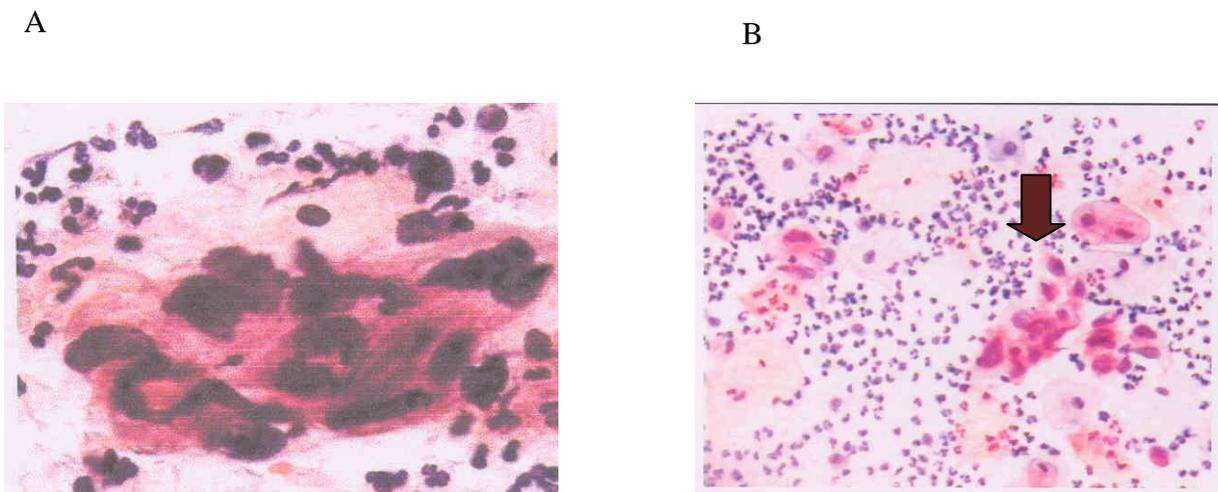


Fig.4: A e B) grupos de células mostrando intensa hiperchromasia, indentações nucleares e inversão da relação núcleo citoplasma (seta) (1000x e 400x, coloração de Papanicolaou, acervo pessoal).

Segundo a noção básica da história natural da neoplasia de colo uterino, NIC1, NIC2 e NIC3 seriam estágios de uma única doença, constituindo um contínuo em fases progressivas da doença. Tal afirmação tem sido questionada, uma vez que estudos mostram que, na maioria das mulheres com diagnóstico de NIC 2 e NIC 3, não se havia detectado alterações sugestivas de NIC1 em seus testes anteriores. O resultado foi interpretado como indicação de que NIC 1 e NIC 2/ NIC3 representariam distintos processos de doença, nos quais NIC 1 seria a manifestação morfológica da infecção pelo HPV, enquanto que, NIC2/ NIC3 constituiriam, além da própria manifestação morfológica da infecção pelo HPV, a verdadeira lesão precursora do carcinoma do colo uterino (Schiffman, 1995).

A terminologia das lesões intra-epiteliais cervicais tem evoluído ao longo dos anos e continuam se modificando nos dias de hoje. Segundo Rosai *et al.*, (1996), algumas premissas básicas caracterizam estas lesões:

1 – Praticamente todos os carcinomas invasores são precedidos por um estágio no qual as células anormais são confinadas ao epitélio (estágio intraepitelial);

2 – As lesões intraepiteliais compartilham muitas características citológicas com o estágio invasivo, como, por exemplo, aumento do tamanho nuclear, irregularidades e hiper cromasia nuclear, aumento da atividade mitótica e alteração do padrão de maturação, existindo, ainda, diminuição ou ausência de glicogênio;

3 – As células de lesões invasoras mostram diversas anormalidades morfológicas que estão relacionadas a alterações citogenéticas, ploidia de DNA<sup>2</sup>, proliferação celular e alterações moleculares. Lesões de baixo grau costumam ser euplóides<sup>3</sup> ou poliplóides<sup>4</sup>, enquanto que as lesões de alto grau costumam ser aneuplóides<sup>5</sup>. Relação similar tem sido demonstrada no que diz respeito à expressão aberrante de várias queratinas, proteína p53 e oncogene “*ras*”. As evidências sugerem a existência de uma seqüência de eventos que, em alguns casos, leva à progressão da doença e, em outros, para e até mesmo regride;

---

<sup>2</sup> Quantidade de DNA de cada célula (Alberts, *et al.*, 1997)

<sup>3</sup> Quantidade de DNA normal de uma célula humana (2n) (Alberts, *et al.*, 1997).

<sup>4</sup> Quantidade acima do normal de DNA em uma célula etc., múltiplo de n (Alberts *et al.*, 1997).

<sup>5</sup> Quantidade acima do normal de DNA em uma célula, não sendo múltiplo exato de n (Rubin & Farber, 1999).

<sup>6</sup> Substituição do epitélio maduro (no caso, glandular) por outro da mesma linhagem, também maduro (no caso, escamoso) (Brasileiro Filho, *et al.*, 2000).

4 – Na maioria dos casos, as lesões envolvem, não o epitélio escamoso nativo e, sim, as áreas de metaplasia<sup>6</sup>, localizadas na zona de transformação (Rosai *et al.*, 1996).

As NICs usualmente desenvolvem-se em epitélio escamoso metaplásico da zona de transformação. As lesões vão desde neoplasia intraepitelial leve, também chamada de NIC 1, até a severa, ou NIC 3. A diferenciação da NIC raramente é uniforme ao longo da área afetada e tende a ser mais leve adjacente ao epitélio ectocervical e mais severa adjacente ao epitélio endocervical. Uma mulher com disceratose persistente no exame citológico, tem um risco 28 vezes maior de desenvolver um carcinoma invasor, quando comparada com aquelas cujas alterações foram revertidas com tratamento (McIndoe *et al.*, 1984; O’Shaughnessy *et al.*, 2002).

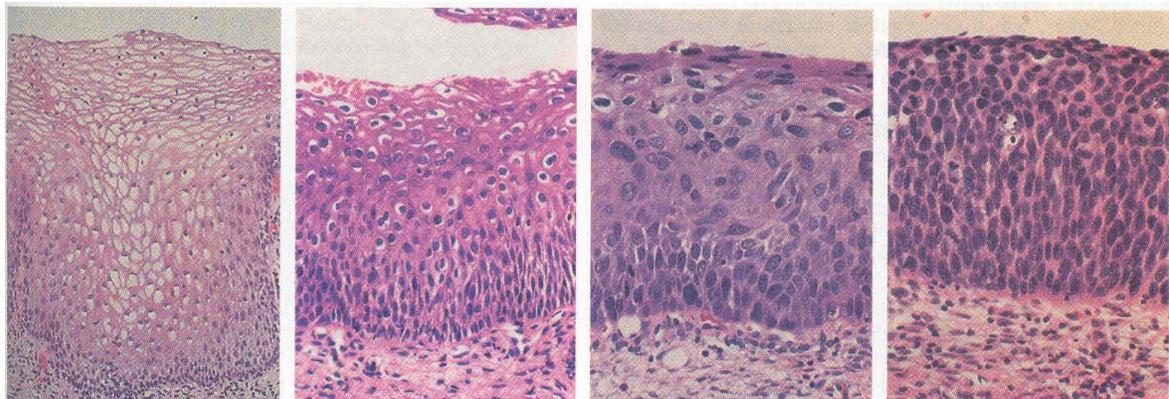
As NICs são compostas por uma população heterogênea de células com grande diversidade em relação ao seu grau de maturação, proliferação e atipia. Com a classificação das NICs, as lesões são graduadas em 1, 2 e 3, correspondendo à displasia leve, moderada e severa/carcinoma “*in situ*”. Clinicamente, a distinção mais importante é entre NIC1 (lesão escamosa intraepitelial de baixo grau) e NIC 2 e 3 (lesão escamosa intraepitelial de alto grau), pois são tratadas de maneiras diferentes. As NICs têm sido tradicionalmente graduadas de acordo com a espessura de comprometimento do epitélio escamoso normal por células parabasais proliferadas anormais (na espessura), considerando-se também atipia nuclear e figuras de mitose (Kurman *et al.*, 1992).

---

<sup>6</sup> Substituição do epitélio maduro (no caso, glandular) por outro da mesma linhagem, também maduro (no caso, escamoso) (Brasileiro Filho, *et al.*, 2000).

As neoplasias intraepiteliais cervicais são caracterizadas por proliferação e maturação celulares anormais, com presença de atipias nucleares (Kurman *et al.*, 1992). As anormalidades como: aumento nuclear, aumento da relação núcleo/citoplasma, pleomorfismo e hipercromasia, estão presentes em níveis variáveis do epitélio a partir da camada basal com presença de mitoses atípicas. A atividade mitótica está freqüentemente aumentada. Embora as mitoses atípicas sejam encontradas nas NIC 1, são vistas com maior freqüência nas NICs 2 e 3 (Kurman *et al.*, 1992). As figuras de mitose normais variam em número e não afetam o diagnóstico (Buckley, 1995).

A maturação anormal do epitélio se manifesta pela perda da polaridade e desorganização arquitetural. O grau de maturação é inversamente relacionado com a severidade da lesão. As células parabasais imaturas possuem relação núcleo/citoplasma invertida. A maturação costuma ocorrer nas camadas mais superficiais, nas quais as células adquirem citoplasma mais eosinofílico (Kurman *et al.*, 1992). Nas NIC 1 (fig.5), a maturação citoplasmática ocorre nos 2/3 mais superficiais do epitélio. Na NIC 2, a maturação citoplasmática é limitada ao terço superior do epitélio. Já na NIC 3, a maturação citoplasmática, que é mínima, ocorre apenas em pequena porção do terço superficial do epitélio, ou está ausente (Buckley, 1995).



NORMAL

NIC 1

NIC 2

NIC 3

Fig. 5: Características histológicas arquiteturais das NIC 1, NIC 2 e NIC 3, comparadas com epitélio normal (modificada de Kumar *et al.*, 2005).

A atipia nuclear é a marca registrada das neoplasias intraepiteliais cervicais e, geralmente, tomam duas formas: coilocitose e discariose. A forma que ocorre mais freqüentemente nas camadas mais superficiais e é a manifestação da infecção pelo HPV, também chamada de coilocitose. A coilocitose pode ser confundida com epitélio escamoso normal com proeminente vacuolização citoplasmática. Entretanto, além das atipias nucleares presentes nos coilócitos, estes se apresentam como uma alteração focal, enquanto que as células vacuoladas do epitélio normal estão presentes em uma área mal definida de epitélio (Kurman *et al.*, 1992).

A outra forma de atipia, também chamada de discariose, está presente nas camadas mais profundas do epitélio, nas NIC 1, e ocupa progressivamente níveis mais superficiais do epitélio conforme avança para NIC 2 e NIC3. Estas células atípicas têm aumento da relação núcleo/citoplasma, condensamento de cromatina, hiperchromasia e pleomorfismo nuclear (Kurman *et al.*, 1992). Se a proliferação está confinada ao terço inferior do epitélio, a lesão é classificada como NIC1. Os dois terços superiores do epitélio contêm células

maduras e outras anormais, com cromatina condensada e núcleos pleomórficos. Nesta categoria estão incluídas, também, as lesões caracterizadas por coilocitose com mínima proliferação na camada basal ou, até mesmo, sem proliferação da camada basal (Kurman *et al.*, 1992).

Quando a proliferação das células parabasais atípicas envolve entre 1/3 e 2/3 da espessura do epitélio, a lesão é classificada como NIC 2 e, mais de 2/3 da espessura do epitélio escamoso, como NIC 3 (lesão escamosa intraepitelial de alto grau, conforme classificação citológica de Bethesda) (Kurman *et al.*, 1992). As nomenclaturas utilizadas para diagnóstico das lesões e a equivalência entre as mesmas estão apresentadas no quadro 1.

As alterações associadas ao HPV, tais como coilócitos e multinucleação, são vistas mais frequentemente associadas a NIC 1 e NIC 2 e costumam ser mais discretas ou ausentes em NIC 3, provavelmente reflexo da integração do HPV ao genoma das células (Buckley, 1995).

Quadro 1: Equivalências entre as classificações e nomenclaturas utilizadas na histologia e citologia das lesões precursoras e invasivas do colo uterino.

<i>Tradicional</i>	<i>Richart (histologia)</i>	<i>Bethesda (citologia)</i>
Normal	Normal	Negativo
HPV	HPV	LEIBG
Displasia Leve	NIC 1	
Displasia Moderada	NIC 2	LEIAG
Displasia Severa	NIC 3	
Carcinoma “in situ”		
Carcinoma invasor	Carcinoma Invasor	Carcinoma invasor

### 1.3 O HPV E O CÂNCER DO COLO UTERINO

Uma das maiores descobertas em etiologia do câncer em seres humanos, foi o reconhecimento de que o câncer cervical é uma consequência da infecção por alguns tipos de HPV. Em termos de saúde pública, este achado é quase tão importante quanto a descoberta da associação entre o fumo e o câncer de pulmão e da associação da infecção crônica pelos vírus da hepatite B ou da hepatite C e o risco de câncer de fígado (Bosch, *et al.*, 2002).

A infecção pelo papiloma-vírus humano (HPV) tem sido estabelecida como a causa principal das neoplasias intra-epiteliais cervicais (NICs) e do câncer cervical (Kjellberg *et al.*, 2000; van der Graaf *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2009). Além disso, a infecção pelo HPV é considerada uma das doenças sexualmente transmissíveis (DST) mais comuns ao redor do mundo (Sedlacek, 1999; Falls, 1999, Ledger *et al.*, 2000), sendo detectada em quase 100% das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo uterino (Murphy *et al.*, 2003). Em 1996, o “Center for Disease Control and Prevention” (CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças / USA) estimava em 500 mil a 1 milhão de casos novos por ano de infecção pelo HPV, enquanto estimava 80mil novos casos de SIDA (síndrome da imunodeficiência adquirida), 200 a 500 mil casos novos de herpes, 100 mil casos de sífilis e 200 mil casos de gonorréia (Okada *et al.*, 1999).

Os fatores de risco (Fig.6) associados à progressão da doença (carcinogênese), isto é, progressão da infecção pelo HPV para transformação das células do epitélio escamoso dando origem às lesões precursoras e posteriormente ao câncer do colo uterino, incluem comportamento sexual de alto risco, infecção persistente pelo papiloma-vírus humano

(HPV), fumo, imunossupressão e baixa condição sócio-econômica (Rivoire *et al.*, 1993; Yuenyao & Ramirez, 2002; Harris, *et al.*, 2004).

O comportamento sexual de alto risco diz respeito a diversas práticas, tais como: idade precoce da primeira relação sexual (coitarca precoce), múltiplos parceiros sexuais (mais de três em um período de 12 meses), não utilização de preservativos, elevada paridade (número elevado de filhos) e ocorrência de outras DSTs (doenças sexualmente transmissíveis) tais como sífilis, *chlamidia*, *gardnerella*, *trichomonas* e *herpes simplex* (Rivoire *et al.*, 1993; Yuenyao & Ramirez 2002).

Estudos epidemiológicos têm demonstrando que o HPV está presente em virtualmente 100% das mulheres com câncer do colo uterino. Por outro lado, grande parte das mulheres que tem diagnóstico de infecção pelo HPV, freqüentemente cura a infecção de modo espontâneo e apenas uma minoria desenvolve infecção persistente e evolui para lesões pré-neoplásicas (Eluf Neto, 1998). Isso leva a crer que, sob ponto de vista do comportamento biológico, trata-se de uma doença, com duas patogenias, uma delas “infectante” e a outra “transformante” (Schiffman, 1995).

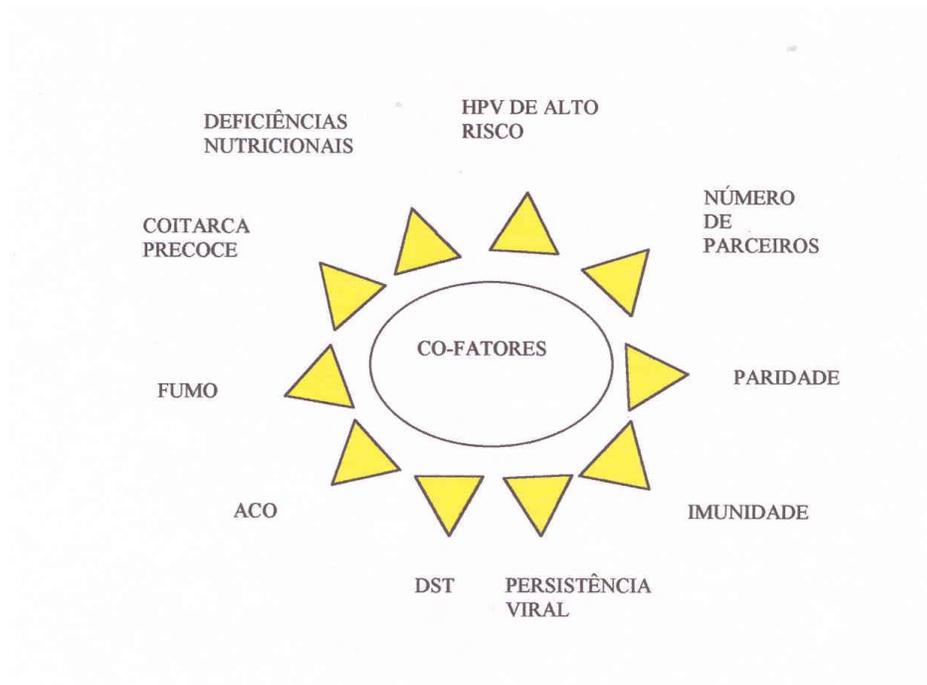


Fig. 6: Co-fatores na carcinogênese do colo uterino (ACO = anticoncepcional oral; DST = doença sexualmente transmissível).

Entretanto, estes estudos indicam que o papel etiológico do HPV é pouco claro e a relação temporal entre causa e consequência pouco conhecida (Keating *et al.*, 2000; van der Graaf *et al.*, 2002). Uma vez que a maioria das pacientes com infecção pelo HPV não vai desenvolver lesões invasoras, a infecção por HPV isolada é provavelmente insuficiente para completar a transformação neoplásica das células escamosas cervicais, sugerindo o envolvimento de outros eventos genéticos e epigenéticos na carcinogênese (Dong *et al.*, 2001).

## 1.4 O VÍRUS

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 pares de bases (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 HPV que infectam mucosa têm predileção pelo trato genital e estão subdivididos em dois grupos: os chamados de baixo risco para o desenvolvimento de câncer (tipos 6, 11, 40, 42, 44, 61), relacionados a lesões benignas exofíticas, e os de alto risco oncogênico (tipos 16, 18 e 31), relacionados às lesões intra-epiteliais e invasoras do colo uterino (Stoler, 1996; Villa, 1998; Candeias & Racz, 1999; Sedlacek, 1999).

Além disso, os HPV de alto risco são ainda divididos em HPV's relacionados ao HPV 16, que são os tipos 16, 31, 33, 35, 52 e 58 e HPV's relacionados ao HPV 18, que são os tipos 18, 39, 45, 59 e 68 (Banura, 2010).

Em diferentes estudos, baseados em PCR (reação em cadeia da polimerase), o HPV foi encontrado em 44% a 77% das NIC1, 69 a 91 % das NIC2, 86 a 100% das NIC3 e de 68 a 98% dos carcinomas invasores. O HPV 16 é o mais freqüentemente relacionado às NICs e em 20 a 30% dos casos há associação entre eles. (Bergeron, *et al.*, 1992; Kellokoski, *et al.*, 1992; Goldsborough, *et al.*, 1992; Wieland & Pfister, 1999).

O genoma de diversos papilomavírus, tanto animais como humanos, já foram inteiramente seqüenciados. O genoma do vírus é dividido em três regiões (Romanos *et al.*, 2002):

- Região Inicial (E – “*early*”), que codifica para as proteínas envolvidas na replicação do DNA viral e transformação celular (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 e E8);

- Região Tardia (L – “*late*”), que codifica para as proteínas do capsídeo viral (L1 e L2);

- Região Regulatória (LCR – “*long control region*”), onde se encontram a origem de replicação e os elementos para a transcrição e replicação viral.

## 1.5 GENOMA VIRAL E ONCOGENES

A infecção da célula pelo HPV se manifesta 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 infectadas. Diferentes tipos de HPV têm diferentes níveis de associação com o câncer e estes níveis, presumivelmente, refletem a variação da potência de suas respectivas oncoproteínas virais, 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*INK4* (Keating *et al.*, 2001).

O genoma do HPV é composto por 9 a 10 genes, sendo 7 a 8 na região precoce (E) e dois na região tardia (L) (Fig.7). Os genes precoces estão envolvidos na replicação viral (E1 e E8), no controle da transcrição (E2 e E7), na maturação do vírus e alteração da matriz intracelular (E4) e no estímulo da proliferação e transformação celulares (E5, E6 e E4). A

região tardia compreende dois genes, L1 e L2, que representam as proteínas principal e secundária do capsídeo, respectivamente. (Villa, 1998).

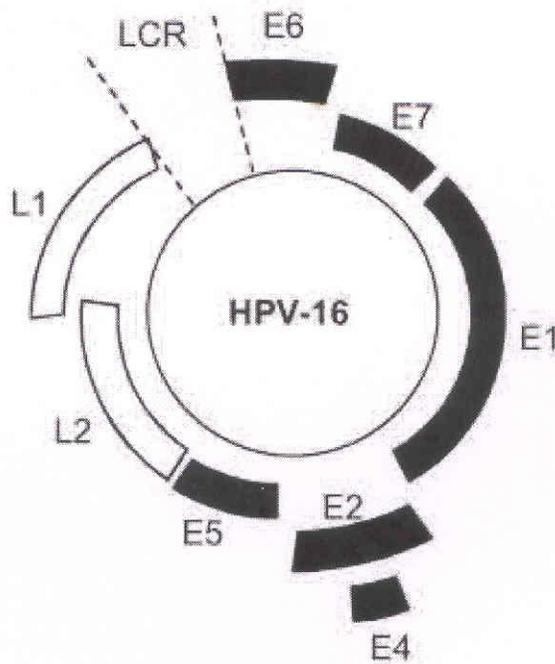


Fig. 7: Representação esquemática do genoma do HPV-16, mostrando os genes da região inicial (E1 a E7), da região tardia (L1 e L2) e da região regulatória (LCR) (Munger & Howley, 2002).

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

pulmonar de pequenas células, osteossarcoma, câncer de mama, de bexiga e de cólon (Wieland & Pfister, 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. Isso se deve principalmente pelo fato do HPV induzir alterações no funcionamento das proteínas nucleares pRb e p53, mesmo na presença de seus respectivos genes perfeitamente normais (Wieland & Pfister, 1999).

As mutações no gene Rb ou inativações da proteína pRb causam proliferação celular desordenada. A desregulação ou a proliferação é um degrau do desenvolvimento multi-escalonado dos tumores malignos (Wieland & Pfister, 1999).

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

A proteína celular p53, codificada pelo gene P53, localizado no cromossomo 17, suprime a transcrição de alguns genes celulares, porém seu maior efeito supressor de tumor é devido à ativação transcricional dos genes que mantêm a estabilidade genômica. Havendo dano do DNA celular, a expressão de p53 é estimulada, o que por sua vez ativa a expressão de certos genes celulares como o P21, o qual leva à interrupção do ciclo celular na fase G1 (G = “*gap*” ou lacuna) ou induz a apoptose (Wieland & Pfister, 1999).

A proteína p16 $INK4$ , produto do gene CDKN2A, é uma proteína inibidora de quinase dependente de ciclina (CDK) (proteína supressora tumoral). Sua função é desacelerar o ciclo celular por inativação das quinases dependentes de ciclina (CDK), que fosforilam a proteína do retinoblastoma (Rb). Alguns estudos têm demonstrado que a expressão da p16 $INK4$  é marcadamente influenciada pela expressão da proteína Rb. A superexpressão da proteína p16 $INK4$  tem sido demonstrada em carcinomas do colo uterino devido à inativação funcional da pRb pela oncoproteína E7 do HPV. (Sano *et al.*, 1998; Agoff, *et al.*, 2003).

Vários estudos têm demonstrado que a inativação da pRb é recíproca com a expressão da p16 $INK4$ , às vezes mostrando-se em co-expressão. (Sano *et al.*, 1998; Agoff, *et al.*, 2003).

## **1.6 PROTEÍNA p16 $INK4$ E CICLO CELULAR**

As células se reproduzem pela duplicação de seus conteúdos e, então, dividem-se em duas. Este ciclo de divisão celular é a maneira pela qual todos os seres vivos são reproduzidos. Antigamente, o ciclo celular era monitorado apenas pela observação de eventos de segregação cromossômica à microscopia óptica. Recentemente, estudos mostraram que há um sistema-controle do ciclo celular, dependente de uma série de proteínas que coordenam o ciclo como um todo (Alberts *et al.*, 1997).

O ciclo celular é dividido em quatro fases principais, denominadas: período S, G1, G2 e M e um compartimento fora do ciclo celular, denominado G0. Os períodos S, G2 e M consomem tempo mais ou menos constante e a passagem de uma fase para a outra é feita através de um ponto de parada também denominado de ponto de checagem (“*check-point*”). Após a fase M, as células estáveis deixam o ciclo celular e passam ao compartimento G0, também chamado de não-replicativo, do qual vão sair ao serem estimuladas, retornando ao ciclo na fase G1 (Brasileiro Filho *et al.*, 2000; Morgan, 2007).

A fase S é a fase de síntese do ciclo celular na qual ocorre a replicação do DNA. A fase M corresponde à fase mais dramática, na qual acontece a mitose (divisão celular propriamente dita). O intervalo entre o término da mitose e o início da síntese é chamado de G1 e o intervalo entre o final da síntese e o início da mitose é chamado de G2. As fases G1 e G2 propiciam um tempo adicional para o crescimento celular (Alberts *et al.*, 1997; Morgan, 2007).

O sistema-controle do ciclo celular é um dispositivo bioquímico que opera ciclicamente, construído a partir de uma série de proteínas que interagem entre si e que induzem e coordenam os processos dependentes essenciais responsáveis pela duplicação e divisão celulares. Em um ciclo celular padrão, o sistema-controle é regulado por interrupções que podem parar o ciclo nos pontos de parada (“*check-points*”) (Alberts *et al.*, 1997). Estas interrupções são importantes para permitir que o sistema-controle do ciclo celular seja regulado por sinais provenientes do meio ambiente. Estes controles ambientes, em geral, agem sobre um dos dois principais pontos de checagem celular: em G1, antes de entrar em fase S e em G2, no início da mitose (Sherr, 1996; Alberts *et al.*, 1997).

O ciclo celular é controlado por uma série de proteínas reguladoras, denominadas ciclinas, cujas concentrações se elevam e decrescem durante o ciclo celular, formando um

complexo com outra classe de proteínas presentes, as quinases, denominadas de CDK. Os complexos ciclina – quinases fosforilam várias proteínas do substrato envolvidas na iniciação da duplicação do DNA, na formação de fusos mitóticos e em outros eventos do ciclo celular (Alberts *et al.*, 1997; Brasileiro Filho *et al.*, 2000; Contran *et al.*, 2001) (Fig.8).

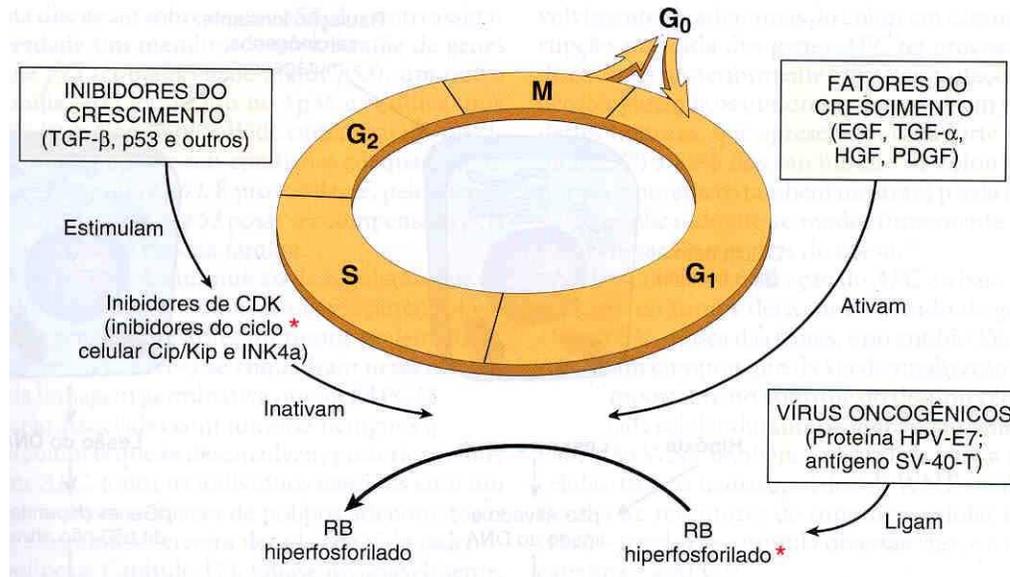


Fig.8: ciclo celular (Kumar, *et al.*, 2005).

A formação, ativação e separação dos complexos ciclina-CDKs são os eventos fundamentais que coordenam o ciclo celular. As ciclinas são assim chamadas porque elas sofrem um ciclo de síntese e degradação em cada ciclo de divisão celular (Alberts *et al.*, 1997). As CDKs são funcionantes apenas quando ligadas as ciclinas (Brasileiro Filho *et al.*, 2000; Morgan, 2007).

Uma vez iniciado o ciclo celular, ele não progride automaticamente. Os pontos estratégicos de “parada” do ciclo, os chamados “*check-points*”, só são ultrapassados mediante estímulos apropriados. Por tanto, existem vários fatores que estimulam o ciclo

celular e muitos outros que tendem a inibi-lo. Entre estes, os mais estudados são algumas proteínas inibidoras do complexo CDK- ciclina, como por exemplo, a p21 e a p16INK4 (Brasileiro Filho *et al.*, 2000; Morgan, 2007).

Vários estudos têm demonstrado que o produto de dois genes precoces (E) 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; Kisseljon, 2008). A expressão da p16INK4 está relacionada com a expressão de E6/E7, necessária para a progressão para doença transformante (Cuschieri & Wentzensen, 2008). A capacidade destes genes de immortalizar queratinócitos é explicada pela sua habilidade em interagir e neutralizar a função da pRb (Giarré *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2001). A pRb, ciclina D, CDK4 e p16INK4 são as quatro chaves que regulam o ciclo celular normal, sendo que qualquer uma delas pode estar mutada em células tumorais (Cotran *et al.*, 1999). Em células quiescentes, a pRb é hipofosforilada e associada com E2F (fator de alongação 2). Quando expostas a sinais mutagênicos, 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. 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 representa 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 p16INK4, leva ao acúmulo de pRb hipofosforilado, seqüestro de E2F e conseqüente parada

do ciclo celular na fase G1 (Sherr, 1996; Huschtscha & Reddel, 1999; Giarré *et al.*, 2001; Kisseljon, 2008).

A p16 $INK4$  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 regulam o ponto de checagem da fase G1 do ciclo celular (Sano *et al.*, 1998; Kubo *et al.*, 1999). 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 $INK4$  pode estar associada com imortalidade, vem da observação de que a deleção do gene P16 $INK4$  é comum em linhagens de células tumorais imortais (Huschtscha & Reddel, 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 & Reddel, 1999; Munro, *et al.*, 1999).

Estudos têm demonstrado que o nível de p16 $INK4$  aumenta em células em estado senescente, ou seja, ocorre acúmulo do 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 (Huschtscha & Reddel, 1999; Shay & Wright, 2004).

Isto está relacionado ao conceito básico de que as células têm uma capacidade limitada para se multiplicarem. Após um número fixo de divisões, as células estacionam em um estágio terminal sem capacidade de se dividir, conhecido como senescência. A maneira como as células em proliferação podem contar o número de divisões ainda está sendo

investigado, mas uma das teorias é a do encurtamento dos telômeros, os quais diminuiriam um pouco a cada divisão, até parada do ciclo (Bodnar *et al.*,1998; Munro *et al.*,1999; Tsutsui *et al.*,2002; Kumar *et al.*,2005).

Com base na observação de que elevados níveis de p16<sup>INK4</sup> acompanham a senescência celular, a perda da expressão do P16<sup>INK4</sup> 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<sup>INK4</sup> seja um passo essencial no processo de carcinogênese (Serrano *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1998; Huschtscha & Reddel 1999; Hausen,2006). O mecanismo de acúmulo de p16<sup>INK4</sup> em células que se aproximam da senescência ainda é desconhecido e requer elucidação (Huschtscha & Reddel 1999).

A perda da expressão da p16<sup>INK4</sup> devido a metilação está associada com uma progressão finita do ciclo celular e perda da função pRb devido a expressão da oncoproteína E7 do HPV, resultando em fuga para a senescência. Parece que a pRb e a p16<sup>INK4</sup> agem na mesma via para o controle do ciclo celular, uma vez que a p16<sup>INK4</sup> mantém a pRb em estágio inibitório por inibir a fosforilação da pRb pelas CDKs (Reddel *et al.*, 2000; Murphy *et al.*,2003; Hausen, 2006).

Segundo Sano *et al.*, (1998), estudos têm demonstrado que a inativação da pRb, ocasionada pelas oncoproteínas virais, leva a um contínuo aumento da expressão da p16<sup>INK4</sup> em vários tipos de câncer, inclusive do colo uterino.

As evidências indicam que a senescência representa a maior barreira para a carcinogênese. Entretanto, a forma como ela ocorre ainda permanece enigmática. A imortalização não é suficiente para a carcinogênese mas um pré-requisito necessário para o

acúmulo de número razoável de alterações genéticas necessárias para a malignidade (Reddel *et al.*, 2000).

É importante caracterizar os elementos que envolvem o envelhecimento e senescência dos queratinócitos, os quais precedem a expressão de p16<sup>INK4</sup>. Estudos preliminares parecem demonstrar que a p16<sup>INK4</sup> não é expressa durante a renovação e estratificação normal do epitélio escamoso *in vivo* (Rheinwald *et al.*, 2002).

## **1.7 OS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA INFECÇÃO PELO HPV E DAS LESÕES RELACIONADAS AO VÍRUS**

Os métodos diagnósticos da infecção pelo HPV e das lesões relacionadas ao vírus dividem-se em dois grandes grupos (Fig.9): aqueles utilizados para determinar a presença de lesões relacionadas ao HPV e aqueles utilizados para determinar a presença de infecção viral. A infecção viral freqüentemente é concomitante com a presença de lesão. Entretanto, nem sempre a presença de HPV-DNA ocorre juntamente com uma lesão. Em muitos casos temos a infecção viral, sem manifestação morfológica qualquer, o que é chamado de infecção latente.

Ao primeiro grupo pertencem a citopatologia, histopatologia, colposcopia e a imunohistoquímica. Estes métodos são utilizados, na maior parte das vezes, em conjunto. Sabe-se que a sensibilidade da citopatologia para o diagnóstico de alterações citopáticas virais é considerada baixa (ao redor de 40%) Ao segundo grupo pertencem a captura de híbridos e a reação em cadeia da polimerase (PCR).

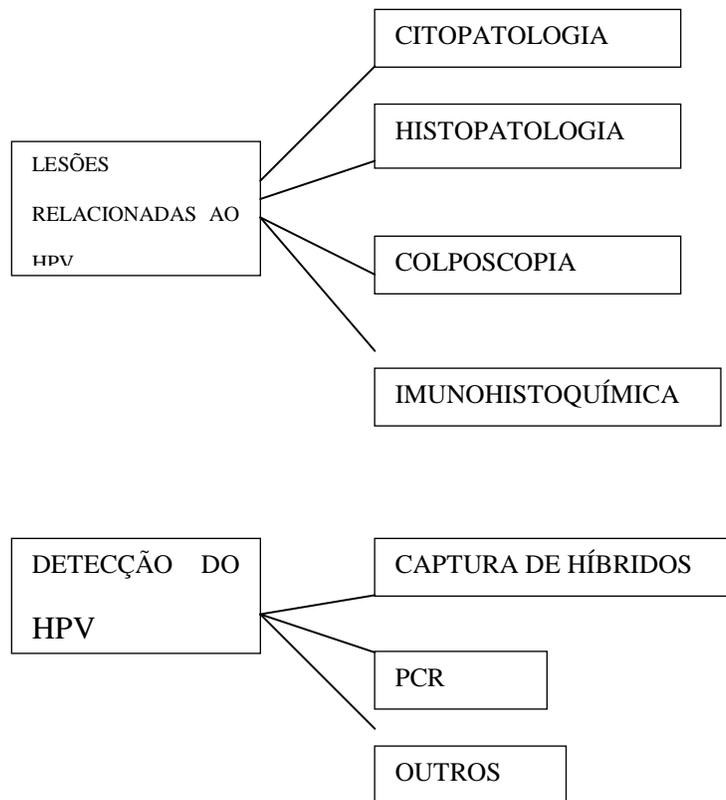


Fig. 9: Estratégias em métodos diagnósticos relacionados às lesões e à detecção da infecção pelo HPV.

### 1.7.1 CITOPATOLOGIA

O exame citopatológico, também chamado de teste de Papanicolaou (Pap) tem sido utilizado desde os anos 40 para avaliação citológica das células cervicais (Papanicolaou,

1942). O sucesso de programas de rastreamento em grande escala utilizando o teste de Papanicolaou com o objetivo de reduzir os índices de carcinoma invasor do colo uterino, tem sido propagado na literatura. E, sem dúvida, é o teste de rastreamento com melhor relação custo-benefício já inventado e utilizado de rotina na prática ginecológica (Falls, 1999).

Em 1988, um pequeno grupo de indivíduos, “*experts*” em citologia e histologia, reuniram-se em um encontro realizado em Bethesda, Maryland, com objetivo de desenvolver um sistema de interpretação para o teste de Papanicolaou, o qual fosse capaz de traduzir para o médico clínico, as alterações citológicas de forma clara e relevante. O resultado deste primeiro encontro foi adotado pelo *National Institute of Health (USA)* com o objetivo de uniformizar os resultados citológicos, mais tarde conhecido como sistema de Bethesda (Falls, 1999; Solomon *et al.*, 2002; Solomon *et al.*, 2004).

O sistema de Bethesda visa três grandes objetivos (Kurman *et al.*, 2004):

- a terminologia deve comunicar ao paciente informação clínica relevante;
- a terminologia deve ser uniforme e com razoável reproducibilidade por diferentes patologistas, em diferentes laboratórios ao redor do mundo;
- deve refletir o entendimento corrente da neoplasia cervical.

O sistema de Bethesda estipula a adequabilidade da amostra, presença de infecções e classifica as anormalidades celulares como lesões escamosas intra-epiteliais. Essas últimas são divididas em dois grandes grupos: lesões escamosas intra-epiteliais de baixo grau (compreendendo alterações por HPV e neoplasia intra-epitelial cervical I (NIC I)) e lesões escamosas intra-epiteliais de alto grau (compreendendo as neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC) 2 e 3 e carcinoma “*in situ*”) (Falls, 1999). Um terceiro grupo, denominado

atualmente ASC, anteriormente denominado de ASCUS que significa “alterações em células escamosas de significado indeterminado”, foi, na última atualização da classificação de Bethesda, dividido em duas formas: ASC-US, utilizado para aquelas situações nas quais as alterações são quantitativamente ou qualitativamente escassas e o chamado ASC-H, utilizado nas situações onde não se pode afastar a possibilidade de lesão escamosa intra- de alto grau (Kurman & Solomon, 1994; Solomon & Nayar, 2004).

Como epitelial já foi dito, o exame citopatológico (teste de Papanicolaou) é o melhor indicador custo- benefício para a detecção de lesões do colo uterino. Quando é identificada a presença de coilócitos associados a atípias nucleares, falhas de maturação, hiperkeratose, binucleação e disceratose, a correlação com o teste de PCR (reação em cadeia da polimerase) para detecção de HPV-DNA é excelente. O exame citopatológico (teste de Papanicolaou) é ainda um excelente indicador para o carcinoma invasor, uma vez que a variação de interpretação interobservador das lesões de alto grau é muito pequena. Devido ao fato da atipia citológica ser determinada de forma subjetiva, a reprodutibilidade dos diagnósticos de alterações celulares mais leves é baixa (Kato *et al.*, 1995; Sedlacek, 1999).

Nos últimos anos, diversas companhias vem desenvolvendo a citologia em base líquida, cujo objetivo é melhorar a qualidade da amostra obtida do colo uterino, aumentando a sensibilidade e reduzindo os índices de falsos-negativos para neoplasias intra-epiteliais escamosas. A citologia em base líquida tem a vantagem de fornecer múltiplas alíquotas representativas de uma amostra citológica única. Além disso, usa um fixador a base de álcool capaz de preservar as características morfológicas das células, manter a integridade do DNA, do RNA e de suas proteínas (Lin *et al.*, 2000)

### **1.7.2 HISTOPATOLOGIA**

O diagnóstico histopatológico das alterações associadas ao HPV é de grande importância pois nele baseia-se, na prática assistencial, a maior parte das decisões terapêuticas das lesões causadas pelo HPV e de suas conseqüências no trato genital (Di Loreto & Alves, 1998). O diagnóstico da lesão deve ser obtido por métodos morfológicos, sendo o padrão-ouro o diagnóstico em produto de biópsias ou produto de ressecção por cirurgia ou alças diatérmicas. A relevância do estudo histopatológico está não apenas em corroborar o diagnóstico de infecção pelo HPV, mas em situá-la no contexto das lesões de eventual capacidade de evolução para neoplasia, através da graduação da lesão, seguimento e avaliação da resposta ao tratamento. O exame histológico é, ainda, grande parâmetro para aferição da qualidade da citopatologia. As amostras teciduais oferecem a oportunidade de correlação direta entre o dano morfológico arquitetural e celular com a presença de moléculas indicadoras das múltiplas faces da biologia da infecção (Di Loreto & Alves, 1998).

Embora alguns autores tenham relatado elevado nível de concordância diagnóstica interobservador, ainda existe considerável discrepância, principalmente nas lesões limítrofes, uma vez que, do ponto de vista morfológico, estas alterações formam um espectro (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, podem resultar em significativa variabilidade interobservador e intra-observador (Keating *et al.*, 2001).

### **1.7.3 COLPOSCOPIA**

A colposcopia é um exame de imagem utilizado para avaliação do aparelho genital, feminino, com ampliação entre 3 e 30 vezes. O aparelho óptico utilizado para exame foi idealizado por Hinselmann e Von Franque entre os anos de 1924 e 1925, em Hamburgo (Torres & Riopelle, 1993; ASCCP, 2007),

Durante a 2ª Guerra Mundial, devido ao nazismo, criou-se uma barreira para a difusão da técnica. Entretanto, em alguns países, tais como Espanha, Itália, Brasil, França e Suíça, a colposcopia continuou a se desenvolver (Dexeus *et al.*, 2002). Em 1928, Schiller introduziu o conceito de aplicação de solução de iodo na superfície do colo uterino, com o objetivo de identificar áreas não-glicogênicas para biópsia (ASCCP, 2007).

Atualmente, o exame colposcópico é realizado por médico treinado, com o auxílio de um videocolposcópico, com fonte de luz fria e presença de filtro verde.

A inspeção do colo uterino é feita através da colocação de espéculo e visualização do colo uterino, primeiramente sem adição de qualquer componente químico e a seguir com adição de solução de ácido acético 3% e solução iodo-iodetada (Lugol), prova chamada de Teste de Schiller. A solução de ácido acético 3% provoca coagulação das proteínas das células alteradas, corando-as de branco. Tal alteração não é observada em células normais. Já a solução iodo-iodetada cora intensamente o glicogênio contido nas células normais, originando uma coloração marron escura no colo uterino normal. Por outro lado, as células alteradas não são impregnadas pelo Lugol e permanecem com uma coloração amarelo-ouro.

As alterações de coloração provocadas pelo uso destas duas soluções, guiam o examinador para a realização da biópsia nas áreas alteradas. O exame colposcópico deve ser iniciado no pequeno aumento. Os aumentos maiores são utilizados para observar detalhes e padrões vasculares anormais. O filtro verde pode ajudar no exame do padrão vascular (ASCCP, 2007).

#### **1.7.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA**

A imuno-histoquímica (IHQ) é uma técnica usada para localizar antígenos específicos em células ou tecidos, baseado em reconhecimento antígeno-anticorpo. Este método já tem uma longa história, que iniciou em meados de 1940, quando Coons desenvolveu as técnicas de imunoflorescência 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 são capazes de reconhecer antígenos com alta especificidade. Antígeno é uma molécula que ligada ao anticorpo específico, provoca uma resposta imunológica (Alberts, 1997; Ferreira & Rocha, 2004). A especificidade precisa 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 a 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 epítopo 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). O kit histológico CINtec™p16 $INK4$  contém os reagentes necessários para um procedimento completo de imuno-histoquímica, para ser realizado em amostras embebidas em parafina e fixadas em formalina.

Este kit é baseado nos sistema EnVision, um sistema de detecção em dois passos, baseado em um polímero solúvel em água, ao qual são conjugados os anticorpos secundários (Fig.4).

O sistema EnVision proporciona uma reação imuno-histoquímica rápida, simples e livre de biotina, baseada na utilização da tecnologia dos polímeros. O sistema EnVision é usado com anticorpos primários de coelho ou rato. Este sistema é fácil de usar, em função de ser composto por poucas etapas de realização e com períodos de incubação curtos. Além disso, elimina as reações cruzadas com biotina tecidual.

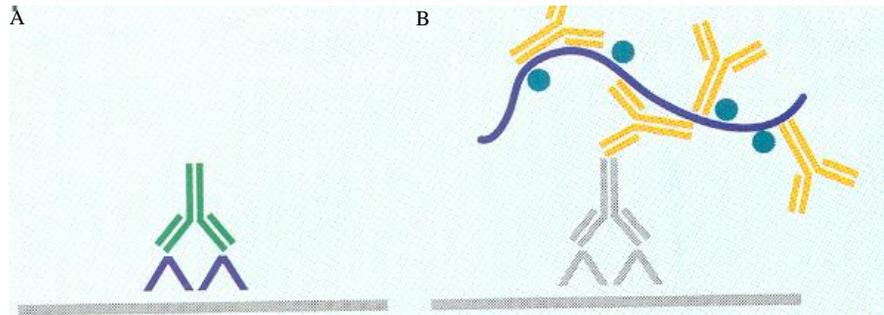


Fig.10: A: aplicação do anticorpo primário; B: aplicação do polímero enzimático.

### 1.7.5 HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR

As técnicas de hibridização molecular atuam, genericamente, com “sondas”, que são fragmentos conhecidos de seqüências nucleotídicas de DNA ou dos RNA viral e que são colocadas na presença das células pesquisadas em uma amostra de interesse, ocorrendo reações “de hibridização” ou “anelamento”, quando as seqüências de bases são complementares entre si (Filho & Alves, 1998).

A detecção desses fragmentos conhecidos de DNA viral, pode revelar não apenas uma infecção pelo HPV, mas informar também qual o tipo viral.

A captura de híbridos é apenas um dos métodos de hibridização molecular utilizados. Uma de suas vantagens é elevada sensibilidade e especificidade. O método utilizado é semelhante as reações imuno-enzimáticas tipo ELISA, com preparo de reações em micro-placas, cuja sensibilidade, quando associada à citopatologia mostra índices que oscilam entre 90 a 100% (Filho & Alves, 1998). Trata-se de um imuno-ensaio não-radioativo que usa sondas de RNA para detectar fita única de DNA-alvo e ele pode identificar a presença de 14 tipos freqüentes de HPV anogenital (Zahm, 1999).

O método se baseia em uma hibridização molecular convencional, em que diferentes tipos de soluções de sondas não radioativas de ácidos ribonucléicos (RNA) são colocadas a reagir com amostras desnaturadas que contém o DNA pesquisado: uma com os tipos de baixo risco/grupo A (HPVs 6, 11, 42, 43 e 44), e outra com nove tipos de alto risco/grupo B (HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 e 56) (Zahm, 1999).

Após a hibridização, as moléculas de DNA ligadas às sondas de RNA adicionadas, contendo os “híbridos” são colocadas em tubo recoberto com anticorpos específicos marcados com fosfatase alcalina. A detecção da reação é feita por quimioluminescência e mensurada em unidades relativas de luz (Zahm, 1999).

#### **1.7.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)**

A PCR é um método poderoso para amplificação de quantidades diminutas de seqüências específicas de DNA-alvo em diversas milhões de vezes. Para realizar-se a PCR podem ser usados esfregaços citológicos, lavados, biópsias transoperatórias de congelação ou tecidos embebidos em parafina. O DNA-alvo nestes espécimes deve ser isolado. Isso pode ser feito por uma digestão não-iônica detergente / protease ou por congelamento e aquecimento do material celular (Filho & Alves, 1998; Zahm & Schneider, 1999).

É necessário que a seqüência-alvo de nucleotídeos seja conhecida de modo que gere iniciadores de oligonucleotídeos apropriados de 20 a 25 bases de comprimento que pareiam regiões específicas do DNA-alvo. Após o anelamento destes iniciadores, a ação de uma DNA polimerase termoestável, como por exemplo, a Taq polimerase, realizará a síntese da fita de DNA alvo. A concentração do DNA-alvo 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 & Alves, 1998; Zahm & Schneider, 1999).

Espécimes como esfregaços citopatológicos, lavagens, biópsias por congelamento ou tecidos embebidos em parafina são adequados. O DNA-alvo nestes espécimes deve ser isolado. Isso pode ser feito com uma digestão não-iônica detergente/protease ou por congelamento e aquecimento do material celular. Para realizar a PCR é necessário o preparo de uma solução contendo:

- amostra de DNA a ser amplificada;
- um par de iniciadores específicos que definem a região-alvo do DNA a ser amplificada;
- DNA polimerase termoestável;
- todos os 4 deoxirribonucleotídeos;
- tampão para estabilizar a DNA polimerase termoestável contendo  $MgCl_2$ , KCl e Tris-HCl, pH 8,3.

A concentração de vários componentes varia para os diferentes tipos de PCR. A PCR é um processo termo-cíclico que inclui três etapas: primeiro, durante a desnaturação (a  $95^{\circ}C$ ), a fita dupla de DNA-alvo é separada em fitas únicas. Segundo, os iniciadores se anelam ao DNA alvo (cerca de  $55^{\circ}C$ ). Os dois iniciadores anelam especificamente as suas seqüências complementares de DNA-alvo de fita única. A distância entre os dois iniciadores é geralmente de umas poucas centenas de nucleotídeos. Terceiro, a extensão do iniciador é desempenhada por uma DNA polimerase termoestável (a  $72^{\circ}C$ ). A

DNA polimerase gera fitas “filhas” de DNA que atravessam a região entre os dois iniciadores.

Ambas fitas simples iniciais de DNA, por conseguinte são convertidas em 4 fitas simples, as quais servem como modelo para o ciclo seguinte de PCR. A PCR é geralmente concluída após 35 a 40 ciclos. Subseqüentemente, a amplificação de PCR é detectada em eletroforese de gel de agarose contendo brometo de etídio e visualizado em luz ultra-violeta ou gel de poliacrilamida corado com solução de nitrato de prata (Zahm, *et al.*, 1999).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para o estudo foram selecionadas amostras do colo uterino de pacientes atendidas no Ambulatório de Patologia do Trato Genital Inferior do Ambulatório Central da Universidade de Caxias do Sul e no Laboratório Diagnose, nas quais foram realizados estudos citopatológico, colposcopia, anátomo-patológico de biópsia dirigida do colo uterino, determinação da presença de HPV-DNA por PCR com tipagem viral e imunohistoquímica para a p16<sup>INK4</sup>.

Foram incluídas no estudo pacientes com suspeita de lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau (LEIBG) detectadas no exame citopatológico convencional de rotina, em anátomo-patológico de biópsia de colo uterino realizada sob orientação colposcópica por suspeita de infecção viral, exame colposcópico alterado ou exame de biologia molecular positivo para HPV-DNA. Estas pacientes foram convidadas a participarem do projeto, ficando comprometidas a retornarem ao serviço a cada 6 meses durante dois anos para seguimento. Nestas oportunidades, as pacientes foram reavaliadas, sendo repetidos os exames de citopatologia e biologia molecular e realizadas novas biópsias quando necessário. No momento da adesão ao projeto, as pacientes foram orientadas a assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As pacientes incluídas no estudo estão listadas no quadro 3. As pacientes ao assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido receberam uma identificação a ser utilizada durante a duração do projeto. A identificação designa todas as pacientes com a letra A (maiúscula) seguida de dois

números separados por barra. O primeiro corresponde a ordem consecutiva de pacientes recrutadas e o segundo corresponde à visita a que o material se refere. Ex.: amostra de secreção de colo uterino designada como A 35/4 corresponde a amostra da trigésima quinta paciente recrutada, em sua 4ª visita.

## **2.2 Citopatologia**

Os exames citopatológicos foram coletados em lâmina de vidro com extremidade fosca e processados de acordo com o método de Papanicolaou (Papanicolaou, 1942), com posterior análise por microscopia óptica, realizada por médico patologista. Os exames citopatológicos foram revistos e classificados de acordo com o preconizado pela classificação de Bethesda (Solomon & Nayar, 2004).

A orientação da classificação é a seguinte: casos “negativos”, quando não for observada nenhuma alteração citológica significativa; “LEIBG”, quando observadas alterações celulares compatíveis com displasia leve/NIC 1 e infecção pelo HPV; “LEIAG”, quando observadas alterações celulares compatíveis com displasia moderada/NIC 2 e acentuada/NIC 3; “carcinoma invasor”, quando mostraram sinais de invasão da camada basal e, por fim, “ASC” para os casos com atipias de significado indeterminado. Foi coletado no momento do exame ginecológico, secreção cérvico-vaginal para pesquisa de HPV-DNA pelo método de PCR.

## **2.3 Colposcopia**

Os exames colposcópicos foram realizados por médico treinado, com auxílio de colposcópio com até 20 aumentos. As biópsias dirigidas do colo uterino foram realizadas apenas quando necessário, na presença de alteração colposcópica sugestiva de lesão. Os

fragmentos foram acondicionados em frascos contendo solução de formol 10% para posterior análise pelo laboratório de patologia.

#### **2.4 Anatomia-patológica**

Os exames de anátomo-patológicos foram processados pelo método de rotina de embebição em parafina e preparação de cortes histológicos de 3 micra de espessura, utilizando-se coloração pela Hematoxilina-Eosina (HE) com posterior análise por microscopia óptica convencional, realizada por médico patologista. A análise das lâminas obedeceu a critérios histológicos propostos por Richart (Richart, 1990), sendo que o material foi classificado como: “normal”, na ausência de quaisquer alterações celulares ou arquiteturais; “NIC 1”, quando detectadas alterações celulares tais como hipercromasia, irregularidade nuclear, mitoses, condensação de cromatina, perda da polarização e desarranjo arquitetural restritas ao terço inferior do epitélio; “NIC 2”, quando estas alterações estavam confinadas a 2/3 do epitélio; “NIC 3”, quando toda a espessura do epitélio mostrava alterações celulares; e, por fim, “HPV”, quando foram detectadas alterações celulares compatíveis com infecção pelo vírus, tais como coilocitose, disceratose, macronucleose, binucleação ou multinucleação e anofilia.

#### **2.5 Biologia Molecular**

A determinação da presença de DNA-HPV e tipagem viral foram realizadas pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Gravitt *et al*, 2000) realizada em dois grupo de amostras. Um deles foi constituído por amostras embebidas em parafina e, outro, por amostras de coleta de secreção cérvico-vaginal conservadas em tampão TE e congeladas em freezer, 20°C negativos. O DNA das amostras, obtidas de esfregaço de colo

uterino, foi isolado e purificado através do uso do *kit GFX Genomic Blood® DNA Purification Kit* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), conforme instruções do fabricante.

O material proveniente de blocos de parafina foi submetido a cortes histológicos com 8µm de espessura. A retirada da parafina foi feita de duas formas: química e térmica. Na retirada da parafina pelo método químico, os cortes histológicos serão acrescidos de 1mL de xilol e incubado a 65°C por 15 minutos. Após este tempo, o material foi centrifugado e lavado em sucessivos banhos de álcool, em concentrações decrescentes, com o objetivo de desparafinizar a amostra. Após a lavagem, o sobrenadante é desprezado e o “*pellet*” seco em temperatura ambiente.

Na retirada da parafina através de aquecimento, cada amostra, acrescida de 200µL de tampão de digestão, é levada ao forno de microondas por 4 ciclos de 15 segundos, agitando-se vigorosamente entre cada um deles. As amostras foram submetidas, então, a centrifugação durante 10 minutos, ao final da qual removeu-se a parafina sobrenadante, adicionando-se 200µL de TEP (6,05g Tris-HCl, 3,72g EDTA, 50µL Triton X-100, completar para 10mL com água destilada).

Após esta etapa, procedeu-se a extração de DNA das amostras. A extração foi feita de duas maneiras: utilizando-se o kit *Wizard® Genomic, DNA Purification Kit* (Promega Corporation, Madison, Wi, USA), conforme instruções do fabricante ou o método orgânico.

O método orgânico constitui no seguinte: cada amostra será acrescida 200µL de enzima de digestão e 200µL de TEP e incubada em banho a 50°C por 48 horas, sendo agitada ocasionalmente. Ao fim das primeiras 24 horas de banho, é acrescentado mais 50µL de TEP. Após o período de incubação, procede-se a inativação da enzima de digestão, com

elevação da temperatura do banho a 96°C, por 15 minutos. Adiciona-se, então, 200µL de Acetato de Amônia 6M, pH 8,5. A amostra é agitada em vortex e após centrifugada. O sobrenadante (que contém DNA) é transferido para um tubo novo e o restante foi desprezado. No novo tubo foi adicionado 600µL de isopropanolol PA frio, misturando com cuidado e incubando em freezer 70°C negativos, por 2 horas. Após a incubação, a amostra foi centrifugada por 15 minutos. A seguir, a fase líquida é cuidadosamente desprezada, adicionando-se 600µL de etanol 70%, misturando por inversão. A amostra foi então centrifugada por 15 minutos. Este passo, que tem como objetivo lavar o DNA, sendo repetido 3 vezes. Por fim, a fase líquida foi desprezada, deixando-se secar o “pellet” sobre papel absorvente. Uma vez seco, o DNA foi ressuspenso em 50µL de tampão TE, pH 7,5 e armazenado em freezer 20°C negativos.

Após a extração do DNA, utilizando-se quaisquer dos métodos, as amostras foram submetidas à PCR, utilizando-se o conjunto de iniciadores genéricos para HPVs, PGMY 09/11 (Gravitt *et al.*, 2000), capazes de amplificar 450 pares de bases (pb) do gene L1 de diversos tipos de HPVs genitais. À mesma PCR são adicionados os iniciadores GH20 e PCO4 (Saiki *et al.*, 1988) que amplificam 268 pb do gene da β-globina humana, servindo como controle interno para avaliação da integridade e suficiência de DNA de cada amostra. A reação em cadeia da polimerase foi realizada em um volume de reação de 20 µL, formada por uma solução equimolar de cada um dos iniciadores genéricos PGMY 09/11 na concentração de 25 µM de cada oligonucleotídeo, iniciadores GH20 e PCO4 (20mM de cada iniciador), 15 mM de 10x PCR Buffer, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de dCTP, 100 µM de dGTP, 100 µM de dATP, 100 µM de dTTP e 0,2µL de *AmpliTaq Gold® DNA Polymerase* (Roche, New Jersey,USA). A amplificação foi realizada em um tubo único,

através da utilização de 40 ciclos em termociclador (*PTC – 100 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Waltham, Massachusetts, USA*). Cada ciclo inclui 1 minuto de desnaturação a 95°C, 1 minuto de anelamento a 55°C e 1 minuto de alongamento da cadeia a 72°C. O primeiro ciclo foi estendido por 13 minutos de desnaturação a 95°C. O último passo de alongamento da cadeia a 72°C foi procedido por 5 minutos, modificado de Gravitt *et al* (2000). Foram incluídos controles positivos e negativos na reação. Os controles positivos usados são compostos por DNA de plasmídeo, contendo genoma completo de HPV, gentilmente cedidos pela Dra. Luisa Lina Villa (Instituto Ludwig para Pesquisa do Câncer – São Paulo). O controle negativo utilizado é um tubo com a mistura da reação, porém sem DNA.

Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (1,05g de agarose dissolvido em 75mL de TBE 0,5x), acrescido de 4µL de brometo de etídio a 10mg/mL. O tampão TBE 0,5x foi preparado usando 5,5g de ácido bórico, 10,8g de Tris, 0,925g de EDTA e 2 litros de água destilada. A eletroforese foi conduzida em tampão 0,5x TBE pH 8,3 a aproximadamente 110V constantes. O marcador de peso molecular  $\phi$ X174/Hae III (*Invitrogen, Frederick, Mariland, USA*) foi aplicado em cada gel. Os géis foram visualizados e analisados sob luz ultravioleta.

As amostras foram amplificadas na primeira reação de PCR usando os *primers* degenerados GP-E6-3F (GGG WGK KAC TGA AAT CGG T), GP-E6-5B (CTG AGC TGT CAR NTA ATT GCT CA) e GP-E6-6B (TCC TCT GAG TYG YCT AAT TGC TC), sendo W, A/T; K, G/T; R, A/G; Y, C/T e N, A/C/G/T. Estes *primers* amplificam uma região de 630pb da região E6/E7 dos 38 tipos de HPV mais comuns. A reação de NESTED-PCR é específica e foi realizada para os tipos 6/11, 16, 18, 31, 33, 42, 52 e 58.

Os primers usados e os tamanhos dos produtos amplificados estão discriminados no quadro 2. Todo procedimento, tanto a primeira reação (PCR) quanto a segunda reação (NESTED-PCR), ocorreu segundo Sotlar (2004). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 4%, utilizando-se tampão TBE 1X e posterior coloração com nitrato de prata. Como marcador de peso molecular foi utilizado o pGEM (PROMEGA). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 4%, utilizando-se tampão TBE 1X e posterior coloração com nitrato de prata. Como marcador de peso molecular foi utilizado o pGEM (PROMEGA).

Quadro 2: primers utilizados no PCR “nested”.

<b>Tipo de HPV</b>	<b>primer</b>	<b>Tamanho do fragmento</b>
6/11	TGC AAG AAT GCA CTG ACC AC TGC ATG TTG TCC AGC AGT GT	334 pb
16	CAC AGT TAT GCA CAG AGC TGC CAT ATA TTC ATG CAA TGT AGG TGT A	457 pb
18	CAC TTC ACT GCA AGA CAT AGA GTT GTG AAA TCG TCG TTT TTC A	332 pb
31	GAA ATT GCA TGA ACT AAG CTC G CAC ATA TAC CTT TGT TTG TCA A	263 pb
33	ACT ATA CAC AAC ATT GAA CTA GTT TTT ACA CGT CAC AGT GCA	398 pb
42	CCC AAA GTA GTG GTC CCA GTT A GAT CTT TCG TAG TGT CGC AGT G	277 pb
52	TAA GGC TGC AGT GTG TGC AG CTA ATA GTT ATT TCA CTT AAT GGT	229 pb
58	GTA AAG TGT GCT TAC GAT TGC GTT GTT ACA GGT TAC ACT TGT	274 pb

## 2.6 Imuno-histoquímica

No material histopatológico (blocos de parafina com amostras de colo uterino ) foi realizado exame imuno-histoquímico para detecção da p16INK4. Foram feitos cortes histológicos com 4 micra de espessura montados em lâminas de vidro sialinizadas. Os procedimentos de imuno-histoquímica foram realizados de acordo com as instruções do fabricante do anticorpo. As lâminas sialinizadas foram preparadas em uma bateria composta por um banho de acetona (500ml) por 30 segundos, seguindo 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, são realizados mais dois banhos em 500ml de acetona por 30 segundos cada, seguidos de secagem em estufa a 40°C.

O processo de imuno-histoquímica, 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: remoção da parafina por aquecimento;
- b) reidratação: banhos sucessivos com xilol, etanol 95% e etanol 70%;
- c) reconhecimento dos epítomos através do uso de solução própria contida no kit;
- d) reconhecimento da peroxidase através do uso do reagente próprio presente no kit;
- e) aplicação do anticorpo primário (p16INK4 rato anti-humano, clone E6H4) ou do reagente para controle negativo;

- f) aplicação do DAB;
- g) contracoloração com hematoxilina de Mayer.

A expressão da p16INK4 através de imuno-histoquímica 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. Por outro lado, as células normais coram-se apenas pela hematoxilina utilizada na contra-coloração, que produz uma tonalidade azulada. As amostras consideradas positivas para p16INK4 terão seus quatro melhores campos fotografados. As células neoplásicas positivas serão contadas, relacionando-se com o total de células neoplásicas da amostra. Esta relação originará um percentual de células coradas pelo marcador (Godoy, *et al*, 2008).

## **2. ESTATÍSTICA**

Os dados foram analisados e processados pelo programa SPSS – Windows, 18.0, utilizando-se testes definidos de acordo com a distribuição da amostra.

Os dados foram primeiramente descritos em relação à frequência, utilizando-se estatística descritiva. A análise estatística da correlação entre os grupos foi feita através de testes não-paramétricos, utilizando-se chi-quadrado e teste exato de Fischer.

### **3. RESULTADOS**

Foram incluídas no estudo 125 pacientes. Destas, 7 foram excluídas por motivos pessoais, restando 118 pacientes em seguimento. O resumo dos testes e tempo de acompanhamento das pacientes está na tabela 1.

Das 118 pacientes recrutadas para o estudo, em 13 foi realizada captura de híbridos para determinação da presença de HPV-DNA. Em todas foi realizado teste de PCR. A captura de híbridos foi realizada nas primeiras pacientes e após tornou-se indisponível em função de custos elevados. Das 118 pacientes do estudo, em 107 pacientes (90,7%) detectou-se presença de HPV-DNA por qualquer método de biologia molecular em pelo menos uma das consultas. Em 11 (9,3%) não foi possível determinar a presença do vírus (tabela 2).

Das pacientes submetidas a captura de híbridos (n=13) ,11 foram positivas para HPV-DNA, o que corresponde a 84,6%, sendo que 5 (45,4%) com infecção pelos grupos de alto e baixo risco oncogênico. Apenas uma paciente teve infecção por HPV de baixo risco oncogênico isoladamente. Em 90,9% destas pacientes houve infecção por HPV de alto risco oncogênico.

Tabela 1: Relação das pacientes incluídas no estudo, com respectivos testes realizados.

Paciente	Idade	visitas	CP	AP	PCR	CH	p16/INK4	Obs.
A1	21	6	5	4	5	1	4	
A2	31	2	2	2	2	1	2	
A3	25	3	3	3	3	-	3	
A4	26	2	2	2	2	-	2	
A5	22	1	1	1	1	-	1	
A6	33	6	5	6	6	1	5	
A7	29	3	3	2	3	-	2	
A8	23	4	4	4	4	1	4	
A9	23	4	4	1	4	1	1	
A10	25	2	1	2	2	-	2	
A11	23	3	3	1	3	1	1	
A12	32	1	1	1	1	-	1	
A13	38	4	3	3	4	-	3	
A14	27	1	1	1	1	-	1	
A15	22	3	3	3	3	-	3	
A16	21	1	1	1	1	1	1	
A17	19	3	3	1	3	1	1	
A18	26	4	4	1	4	1	1	
A19	29	1	1	1	1	-	1	se mudou
A20	31	3	3	1	3	-		
A21	24	3	3	3	3	-	3	
A22	27	1	1	1	1	-	1	não quer mais
A23	35	3	3	3	3	-	3	
A24	22	4	4	4	4	1	3	
A25	44	2	2	2	2	-	2	
A26	16	1	1	1	1	-	1	
A27	20	1	1	1	1	-	1	
A28	27	3	3	3	2	-	1	
A29	22	1						EXCLUÍDA (sem seguimento)
A30	25	3	3	2	3	-	1	
A31	27	5	5	2	5	1	2	
A32	20	3	2	1	3	-	1	
A33	34	3	3	1	3	-	1	
A34	28	3	3	3	3	-	3	
A35	39	2	1	-	2	-	-	não quer mais
A36		1						EXCLUÍDA (sem seguimento)
A37	48	2	2	1	2	-	1	
A38	49	2	2	2	2	-	2	
A39	25	3	1	2	3	-	2	
A40	43	3	3	3	3	-	3	
A41	20	4	3	3	4	-	3	
A42	38	1	1	-	1	-	-	
A43	24	1	1	1	1	1	1	
A44	52	4	4	3	3	-	3	
A45	37	1	1	1	1	-	1	
A46	21	2	2	2	1	1	2	
A47	26	1	1	1	1	-	1	
A48	26	1	1	1	1	-	1	
A49		1						EXCLUÍDA (sem seguimento)
A50	27	4	4	4	4	1	3	

(CP:citopatológico; AP:anátomo-patológico; PCR:reação em cadeia da polimerase; CH:captura híbrida).

Paciente	Idade	visitas	CP	AP	PCR	CH	p16/INK4	Obs.
A51	28	1	1	1	1	-	1	
A52	26	2	2	2	2	-	1	
A53	23	1	1	1	1	-	-	
A54	37	1	1	-	1	-	-	
A55	23	3	3	1	3	-	1	
A56	25	2	2	1	2	-	1	
A57	19	1	1	1	1	-	-	não quer mais
A58	29	3	2	2	3	-	2	
A59	46	1	1	-	1	-	-	
A60	38	5	4	4	5	-	4	
A61	28	1	1	-	1	-	-	
A62	30	3	3	1	3	-	1	
A63	22	2	1	-	2	-	-	
A64	38	4	4	1	4	1	1	
A65	20	4	4	4	4	1	4	
A66	50	3	3	-	3	-	-	
A67	38	2	2	-	2	-	-	
A68	36	1	1	1	1	-	-	
A69	19	1	1	1	1	-	1	
A70	20	4	4	4	4	-	3	
A71	31	1	1	-	1	-	-	
A72	25	2	2	-	2	-	-	
A73	32	3	3	1	3	-	1	
A74	33	1	1	-	1	-	-	
A75	50	2	2	1	2	-	1	
A76	28	3	3	3	3	-	3	
A77	27	2	2	1	2	-	1	
A78	26	3	2	3	3	-	3	
A79	39	3	3	2	3	-	2	
A80	23	2	2	1	2	-	1	
A81	20	1	1	-	1	-	-	
A82	22	2	2	-	2	-	-	
A83	34	1	-	1	1	-	1	
A84	21	4	2	1	4	-	1	
A85	19	1	1	1	1	-	1	
A86	28	2	2	2	2	-	2	
A87	48	2	2	2	2	-	2	
A88	18	1	1	1	1	-	1	
A89	33	2	-	1	2	-	1	
A90	19	1	1	-	1	-	-	
A91	32	1	1	1	1	-	1	
A92	16	1	1	-	1	-	-	
A93	57	1	1	1	1	-	1	
A94	23	3	2	3	3	-	3	
A95	41	3	3	3	3	-	3	
A96	24	1	1	1	1	-	-	
A97	43	2	2	2	2	-	2	
A98	20	1	1	1	1	-	1	
A99	23	1	1	1	1	-	1	
A100	51	1	1	-	1	-	-	

Paciente	Idade	visitas	CP	AP	PCR	CH	p16/INK4	Obs.
A101		1	-	-	1	-	-	
A102		2	2	1	2	-	1	
A103	48	3	2	1	3	-	1	
A104	40	3	2	2	3	-	1	
A105	28	3	1	2	3	-	-	
A106	18	1	1	1	1	-	-	
A107	24	3	2	1	3	-	1	
A108	41	1	1	-	1	-	-	
A109	30	3	2	-	3	-	-	
A110	16	3	2	3	3	-	3	
A111	19	1	1	1	1	-	1	
A112	39	1	1	1	1	-	1	
A113	44	2	2	1	2	-	1	
								ANULADA
A115	25	1	-	1	1	-	1	
A116	54	1	1	1	1	-	1	
A117	27	1	1	1	1	-	1	
A118	46	1	-	-	1	-	-	
A119	36	3	2	1	3	-	1	
A120	28	1	1	-	1	-	-	
A121	15	1	1	1	1	-	1	
A122	47	1	1	1	1	-	1	
A123		3	-	-	3	-	-	
A124	20	2	1	-	2	-	-	
A125		1	-	-	1	-	-	

Tabela 2: Resultados da pesquisa de DNA-HPV por biologia molecular.

Pacientes (n)	Resultados de Biologia Molecular
107	HPV +
11	HPV -

O total de pacientes com infecção por HPV confirmada através de PCR em pelo menos uma consulta, é de 107 que corresponde a 90,7% (tabela 2) com idade média de 29,5

anos. Em 42 pacientes (36,5%) detectou-se HPV em todas as consultas (variando de 2 a 6 encontros), com tempo máximo de infecção de 33 meses. A infecção múltipla por HPV (que corresponde a infecção por 2 ou mais tipos diferentes) em uma mesma consulta ocorreu em 54 das 107 pacientes detectadas com o vírus (50,5%). A infecção por diferentes tipo de HPV em diferentes consultas ocorreu em 39 das 107 pacientes infectadas (36,5%). As pacientes que apresentaram infecção múltipla estão listadas na tabela 3. Entre elas, 20 (37%) apresentaram infecção por apenas HPV do grupo de baixo risco oncogênico. Sete (12,9%) pacientes apresentaram infecção por dois ou mais HPV do grupo de alto risco oncogênico. As demais (50,1%) apresentaram infecção por pelo menos um HPV de cada um dos dois grupos de risco oncogênico.

Os tipos de HPV identificados nestas pacientes somaram 28, quais sejam: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 57, 58, 59, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 72, 73 e ND (tipos classificados como Não Determinados).

Tabela 3: lista de pacientes com infecção múltipla por HPV.

Paciente	HPVs encontrados
A1/6	16 + 18
A3/1	45 + 11 + 6 + 16
A4/1	6 + 11 + 18
A5/1	16 + 6 + ND
A6/2	6 + 11 + 68
A7/2	6 + 11 + ND
A8/1	16 + 42 + ND
A8/3	6 + 11 + ND
A11/2	66 + 58
A12/1	18 + 52
A15/1	18 + 53
A17/1	53 + 66 + 6 + 11
A17/3	16 + 51
A20/1	6 + 11 + 33
A21/1	6 + 11 + 39 + 16
A21/2	16 + 18 + 69
A21/3	6 + 11 + ND
A23/1	6 + 11 + ND
A23/3	68 + 31 + 52 + 33
A25/2	6 + 11 + 16

Paciente	HPVs encontrados
A28/3	6 + 11 + 39
A31/1	6 + 11 + 16 + 54
A32/1	ND + 16
A34/2	6 + 11 + 16
A34/3	ND + 16
A38/1	52 + 66
A39/2	6 + 11 + 52
A44/4	6 + 31 + 58
A50/1	6 + 11 + 33
A50/2	42 + 66
A55/2	42 + 57 + 72
A55/3	16 + 42
A56/2	6 + 11
A57/1	6 + 11 + 31 + 52
A60/2	42 + 62
A60/5	6 + 11
A62/3	42 + 53
A63/1	42 + 58
A63/2	18 + 31
A64/1	18 + 42
A65/1	16 + 52 + 64 + ND
A65/2	6 + 11 + 16 + 52 + 58
A70/1	6 + 11
A70/2	6 + 11
A72/2	6 + 11
A73/2	6 + 11
A76/2	6 + 11
A78/1	31 + 58
A78/2	31 + 18 + 58
A86/2	6 + 11 + 18
A88/1	6 + 11
A89/2	52 + 6 + 11
A94/1	6 + 11 + 54 + 67
A94/2	6 + 11 + 33 + 54 + 67 + 69
A94/3	6 + 11
A97/1	6 + 11 + 16 + 62 + 69
A97/2	16 + 18
A102/1	16 + 62
A103/2	ND + 6 + 11
A105/3	68 + 39 + 42
A109/1	ND + 16
A109/2	ND + 16
A110/1	16 + 45 + 66
A115/1	6 + 11 + 16
A118/1	52 + 58 + ND
A119/1	6 + 11 + 58
A119/2	52 + 58
A119/3	52 + 58
A121/1	16 + 52
A122/1	16 + 18
A123/1	35 + 52 + 31
A123/2	35 + 31 + 18 + 58 + 52 + 39 + 33
A123/3	39 + 52 + 31 + 33
A124/2	52 + 68
A125/1	53 + 54

Os tipos virais mais frequentes estão listados com seus respectivos percentuais na Tabela 4. Os percentuais são relacionados ao número de pacientes testadas, considerando que pode haver infecção por mais de um tipo viral.

Tabela 4: HPV mais encontrados e respectivos percentuais.

Tipos HPV	N	Percentual
ND	66	55,9
6	36	30,5
11	34	28,8
16	25	22
52	15	12,7
18	14	11,9
58	13	11
42	13	11

A proteína p16INK4 foi testada pelo método de imuno-histoquímica em 156 amostras, de 94 pacientes diferentes. Do universo de 94 pacientes testadas, 39 (41,5%) foram negativas e 55 (58,5%) foram positivas. O percentual de positividade da p16INK4 variou de 10 a 100% (tabela 5) A correlação entre a presença de DNA-HPV e a expressão da proteína p16INK4 está demonstrada na tabela 6.

Das pacientes que tem infecção múltipla pelo HPV, que foram testadas para p16INK4 (n=49), 35 (71,4%) foram positivas e apenas 14 (28,6%) foram negativas (p = 0,16). Das pacientes que mostraram expressão da p16INK4 maior que 50% de células

neoplásicas coradas (n=38), houve associação estatisticamente significativa com infecção múltipla (26 casos = 68,4%), com p=0,036.

Tabela 5: Distribuição dos casos corados pela p16INK4, relacionados ao percentual de células coradas (n=55).

% de células coradas	n	%
10	6	10,9
20	2	3,6
30	2	3,6
40	6	10,9
50	12	21,8
60	4	7,3
70	1	1,8
80	13	23,6
90	3	5,5
100	6	10,9

Tabela 6: Correlação entre a expressão da p16INK4 e a presença de DNA-HPV por PCR. p = 0,382

	HPV-DNA (PCR)	
	Positivo	Negativo
p16INK4	35 (40,2%)	4 (57,1%)
Negativa	<b>39 (41,5%)</b>	
p16INK4	52 (59,8%)	3 (42,9%)
Positiva	<b>55 (58,5%)</b>	

Entre as pacientes estudadas (n=118), sete (5,9%) evoluíram de LEIBG para LEIAG em períodos de tempo que variaram de 4 a 16 meses. Quatro delas tiveram infecção

múltipla pelo HPV, combinando tipos virais de baixo risco e alto risco. Uma paciente desenvolveu LEIAG e estava infectada pelos HPV 6 e 11. As outras duas pacientes tiveram infecção por HPV não determinado.

A relação da expressão da proteína p16INK4 com os tipos de HPV mais frequentes está explicitada na tabela 7. Os tipos virais que mostraram associação estatística mais forte com a expressão da proteína foram os tipos 6 e 11, seguidos pelos tipos 18, 52 e 42. Em relação aos tipos 16 e 58, não houve associação estatística com a expressão da proteína.

Tabela 7: Associação entre os tipos de HPV e a expressão da proteína p16INK4.

Tipo HPV	n	p16INK4		RR	IC 95%	p
		n	%			
6	+	34	27	79,4%	1,2 a 2,3	0,004
	-	60	28	46,7%		
11	+	32	26	81,3%	1,2 a 2,3	0,003
	-	62	29	46,8%		
16	+	25	16	64,0%	0,7 a 1,6	0,6
	-	69	39	55,5%		
18	+	12	10	83,3%	1,1 a 2,0	0,12
	-	82	45	54,9%		
52	+	14	5	35,7%	0,2 a 1,7	0,11
	-	80	50	62,5%		
58	+	10	6	60,0%	0,6 a 1,7	1,0
	-	84	49	58,3%		
42	+	11	9	81,8%	1,0 a 2,0	0,1
	-	83	46	55,4%		

#### 4. DISCUSSÃO

O estudo foi conduzido a partir de pacientes referendadas devido a algum exame indicando a presença de HPV, seja citologia, colposcopia ou biologia molecular, ou ainda, uma combinação de dois ou mais destes exames. A infecção por HPV foi comprovada em 90,7% das pacientes (107 de um total de 118). A avaliação individual dos resultados da citopatologia no primeiro encontro, mostrou uma taxa baixa de positividade na detecção de LEIBG (27,1%). Isto pode indicar que os médicos não se utilizam apenas dos resultados da citopatologia para avaliar a suspeita de HPV. É possível que a inspeção visual com aplicação de ácido acético e lugol e eventualmente, colposcopia, aliada ao citopatológico, tenha sido a responsável pela indicação das pacientes para investigação. O papel da inspeção visual com ácido acético, principalmente quando associado a outros métodos, é fundamental, como tem demonstrado vários autores, tais como Sankaranarayanan (2003), Cordeiro (2005) e Bragança (2005). A combinação de métodos parece ser eficaz, visto que o DNA-HPV foi encontrado na maioria das pacientes.

Com relação a presença de DNA-HPV por biologia molecular, diversos autores têm encontrado índices diferentes, em estudos conduzidos em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Molano (2003) e seus colaboradores, em um estudo conduzido na Colômbia em associação com a agência internacional de pesquisa do câncer da França, encontrou um índice de infecção por HPV de 16,5% em um universo de 1373 pacientes acompanhadas por um período de 5 anos com o objetivo de avaliar o *clearence* da infecção viral. Já Rosa (2007) encontrou um índice de 12,7% de infecção por HPV em uma amostra de 500 pacientes, em estudo conduzido em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Por outro

lado, a incidência descrita por Banura (2010) em um estudo conduzido em Uganda, foi de 86,6%, em pacientes sem outras co-infecções, embora a idade média nesta população tenha sido de 19 anos. A grande variabilidade entre os estudos pode dever-se a idade média da população estudada, ao método utilizado para identificação do DNA viral e a características próprias de cada população.

Já em relação aos tipos de HPV encontrados, é sabido que existe certa variabilidade entre regiões geográficas. No presente estudo, o HPV 16 foi o quarto mais prevalente, e a incidência não foi tão alta quanto o esperado, ficando na marca de 22% das amostras. Semelhante resultado foi encontrado por Molano (2003), na Colômbia, que descreveu a ocorrência de 16% do HPV 16, seguindo do HPV 58, com 8%. No estudo conduzido por Banura (2010) e colaboradores, o HPV 16 infectou 15,3% da população, tendo sido apenas o terceiro tipo mais freqüente, precedido pelo HPV 51 (com 20% das amostras) e HPV 52, somando 18,7% das amostras. Já Dunne (2007), em estudo conduzido em população em geral, nos Estados Unidos, encontrou ocorrência do HPV 16 muito baixa (apenas 1,5%) e somando os quatro tipos de HPV presentes nas vacinas disponíveis, Dunne relatou 3,4% de ocorrência, mostrando que há imensas discrepâncias.

A infecção por múltiplos tipos de HPV, caracterizada por dois ou mais tipos ao mesmo tempo, foi encontrada em 50,5% das pacientes no presente estudo, achados semelhantes aos de Banura (2010), que encontrou 47,6% de multiplicidade. Já Richardson (2005) relatou 38% de multiplicidade assim como Dunne (2007), que relatou 39,9% de multiplicidade. Molano (2003) relatou apenas 20% das amostras com múltiplos HPV. As pacientes que tiveram infecções múltiplas pelo HPV foram as que permaneceram por tempo maior infectadas. No presente estudo, este tempo de infecção variou de 6 a 28 meses. Além disso,

nas pacientes que evoluíram para LEIAG (n=7), cinco tinham infecção múltipla, sempre incluindo pelo menos um HPV de alto risco oncogênico.

Molano (2003) descreveu persistência do HPV por mais de um ano em 23% das pacientes, diferente deste estudo que mostrou persistência de infecção pelo HPV em 36,5% das pacientes, com um tempo máximo documentado de 28 meses. Rosa (2007) descreveu persistência de 19,3% de infecção por um período de 19 meses. Já Banura (2010) descreveu a persistência de 68,8% das mulheres ao fim de 24 meses. Novamente a discrepância entre os dados em diferentes populações pode estar relacionado a idade das pacientes (Banura estudou pacientes muito jovens). Além disso, neste estudo, a de infecção por HPV não ocorreu necessariamente pelo mesmo tipo. Várias pacientes mostraram infecção por um vírus diferente em cada visita.

A expressão da p16INK4 está intimamente relacionada com a expressão de E6 e E7, necessária para que ocorra a progressão de infecção pelo HPV, para doença transformante. A expressão da p16INK4 em lesões de baixo grau do colo uterino é extremamente variável de estudo para estudo. Neste estudo, o percentual de positividade para a p16INK4 foi de 58,5%. Achado discretamente mais elevado do que o encontrado por Godoy e colaboradores (2008), que relataram 48,3% em população semelhante. Em São Paulo, Eleutério Jr (2007) descreveu positividade de apenas 15,4%. Já na Itália, Benevolo (2006) relatou positividade de 31% em casos de lesão de baixo grau. Klaes *et al.*, (2001) encontraram resultados discretamente mais elevados em um estudo incluindo 139 neoplasias intraepiteliais cervicais, conduzido na Alemanha. No estudo de Klaes, foram relatados percentuais de positividade de 60% nas lesões de baixo grau. A p16INK4 representa um importante biomarcador, pois reflete a presença de um vírus oncogênico e a ruptura do ciclo celular normal. Yildiz (2007) relatou positividade de 80% nas lesões de

baixo grau, embora tenha havido uma variação na intensidade de coloração. Yildiz relatou que a intensidade da expressão da p16INK4 foi apenas basal em 58,3% das lesões de baixo grau e nenhuma delas apresentou intensidade de coloração completa. No presente estudo, ao contrário, a maioria das lesões de baixo grau mostrou forte intensidade de coloração para a p16INK4, com 10,9% dos casos chegando a coloração completa. Ozgul (2008) relatou positividade para p16INK4 em 46,2% das lesões de baixo grau e sempre de fraca intensidade. Ozgul relata ainda que a positividade forte e completa para p16INK4 se relaciona com lesões de alto grau.

É importante a observação de que a infecção múltipla pelo HPV se correlacionou fortemente com a expressão da p16INK4, sendo que 68,4% das pacientes mostraram esta associação. Isso provavelmente se deva ao maior potencial transformante que o HPV possui quando se associam vários tipos virais.

## 5. CONCLUSÃO

Ao final deste estudo de seguimento clínico, podem-se tirar algumas conclusões interessantes:

- ✓ O fator mais importante para persistência das lesões parece ser a ocorrência de infecção por múltiplos HPV's ao mesmo tempo;
- ✓ Na grande maioria das vezes em que há infecção múltipla, unem-se HPV's de alto risco e de baixo risco;
- ✓ Pacientes que têm infecção múltipla, têm maior incidência de positividade para a p16INK4 e a expressão da mesma é mais intensa;
- ✓ As pessoas se infectam por diferentes tipos de HPV's em curto espaço de tempo (menos de 1 ano);
- ✓ A grande maioria das pacientes se infecta por pelo menos um HPV de alto risco;
- ✓ A melhor estratégia para controle das infecções parece ser a associação de diferentes métodos diagnósticos;
- ✓ Pacientes que tiverem expressão da p16INK4 acima de 50% de células coradas, devem ser seguidas mais atentamente;
- ✓ A duração de uma infecção por um determinado tipo de HPV tende a ser menor que 12 meses, em média;
- ✓ O tempo de evolução de uma LEIBG para LEIAG em geral é curto (variou de 4 a 16 meses) e envolve infecção múltipla pelo HPV.

## 6 BIBLIOGRAFIA

- Agoff, S.N., Lin, P., Morihara, J. *et al.*, (2003): p16 $INK4A$  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.
- ASCCP – AMERICAN SOCIETY FOR COLPOSCOPY AND CERVICAL PATHOLOGY – Practice Recommendations. Disponível em <<http://www.asccp.org/edu/practice/cervix/colposcopy>>.
- Banura, C., Sandin, S., Weiderpass, E. *et al* (2010): Type-specific incidence, clearance and predictors of cervical human papillomavirus infections (HPV) among young women: a prospective study in Uganda. **Infectious Agents and Cancer**, 5:7
- Barrasso, R. & Guillemotonia, A (1999): Cérvix e Vagina: Diagnóstico. In: Gross, G.E. & Barrasso, R.: **Papilomavírus Humano – Atlas Clínico de HPV**. ArtMed, 1ª edição, cap. 6, Porto Alegre.
- Barron, B.A. & Richart, R.M. (1968): A statistical model of the natural history of cervical carcinoma based on a prospective study of 557 cases. **J Natl Cancer Inst**; 41(6):1343-53
- Benevolo, M., Mottolise, M., Marandino, F. *et al* (2006): Immunohistochemical expression of p16(INK4a) is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. **Mod Pathol**, Mar;19(3):384-91.
- Bergeron, C., Barrasso, R., Beaudenon, S., *et al.*, (1992): Human Papillomavirus Associated with Cervical Intraepithelial Neoplasia. Great Diversity and Distinct Distribution in Low- and High-grade Lesions. **Am J Surg Pathol**, 16 (7): 641 – 9.

- Bodnar,A., Ouellette, M., Frolkis, M.,*et al.*,(1998): Extension of Life-span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. **Science**, 279 (5349): 349 – 352.
- Bosch, F.X., Lorincz, A., Muñoz, N., *et al.*, (2002): The Causal Relation Between Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Journal of Clinical Pathology**, 55: 244 – 265.
- Bragança, J.F. (2005): Contribuição da inspeção visual com ácido acético e da captura híbrida II como métodos adjuntos à colpocitologia oncológica na detecção das lesões precursoras e/ou do câncer cervical, **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**, 27 (1)
- Brasileiro Filho, G., Guimarães, R.C. & Bogliolo, L. (2000): Distúrbio do Crescimento e da Diferenciação Celular. In: Brasileiro Filho, G. (ed.) **Patologia**. Guanabara Koogan, 6ª ed., cap. 8, Rio de Janeiro.
- Buckley, C.H.: Tumors of the Cervix, (1995), In: Fletcher, C.(ed.) **Diagnostic Histopathology of Tumors**, vol.1, cap. 13, Churchill Livingstone, Hong Kong, pag. 478 – 480.
- Candeias, J.A .N. & Racz, M.L. (1999): In: Alterthum, F.: **Microbiologia**, Atheneu, 3ª edição, Rio de Janeiro.
- Cordeiro, M.R.A., Costa, H.L.F., Andrade, R.P. *et al* (2005): Inspeção visual do colo uterino após aplicação de ácido acético no rastreamento das neoplasias intra-epiteliais e lesões induzidas por HPV, **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**, 27 (2)
- Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T. (1999): **Pathologic Basis of Disease**, W.B. Saunders Company, 6ª edição, cap.8, pag.260 – 328.
- Cuschieri,K. & Wentzensen, N. (2008): Human Papillomavirus mRNA and p16 Detection as Biomarkers for the Improved Diagnosis of Cervical Neoplasia. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. Oct 17; 2536
- De Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker,T.R. *et al.*,(2004): Classification of Papilloma viruses. **Virology**, 324 (1): 17-27.
- Dexeus, S., Cararach, M. & Dexeus, D. (2002): The role of Colposcopy in Modern Gynecology, **Eur J Gynecol Oncol**, 23 (4): 269 – 77.

- Di Loreto, C. E Alves, V.A. F.(1998): Patologia das Lesões Relacionadas ao HPV no Trato Anogenital. In: Bibbo, M. & 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.
- Dunne, E.F., Unger, E.R., Sternberg, M. *et al.* (2007): Prevalence of HPV Infection Among Females in the United States. **JAMA**, 297 (8): 813 – 819.
- Eleutério Jr, J., Giraldo, P.C., Cavalcante, D. *et al.* (2007): Associação Entre a Carga Viral De Hpv De Alto Risco, Expressão De p16INK4 e Lesões Intra-Epiteliais Escamosas Do Colo Uterino. **Rev Assoc Med Bras**; 53(6): 530-5.
- Eluf Neto, J.: Epidemiologia das Lesões Relacionadas ao HPV no Trato Anogenital. In: Bibbo, M. & Moraes Filho, A (1998) : **Lesões Relacionadas à infecção por HPV no Trato Anogenital**, Revinter, 1ª edição, cap. 2, Rio de Janeiro.
- Falls, R.K. (1999): Spontaneous resolution rate of grade 1 cervical intraepithelial neoplasia in a private practice population. **Am J Obst Gynecol**, 181(2): 278-282.
- Filho, A.L. & 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.
- Godoy, A.E.G., Mandelli, J., Oliveira, F.H. *et al.* (2008): p16INK4 expression in precursor lesions of squamous cell cervical câncer related to the presence of HPV-DNA. **Braz J Med Biol Res**. 41(7)583-588.
- Goldsborough, M.D., McCallister, P., Reid,R. *et al.*(1992): A Comparison Study of Human Papillomavirus Prevalence by the Polymerase Chain Reaction in Low

- Risk Women and in a Gynaecology Referral Group at Elevated Risk for Cervical Cancer. **Mol Cell Probes**, 6 (6): 451 – 7.
- Gravitt, P.E., Peyton, C.L., Alessi, T.Q. *et al.*, (2000): Improved amplification of genital human papillomaviruses. **J Clin Microbiol**, 38: 357 – 361.
- Harris, T.G., Kulasingam, S.L., Kiviat, N.B. *et al.* (2004): Cigarette smoking, Oncogenic Human Papillomavirus, Ki-67 antigen, and Cervical Intraepithelial Neoplasia. **Am J Epidemiol**, 159:834-842.
- Hausen, H. (2006): Papillomavirus Infections:A Major Cause of Human Cancer. In: Hausen, H.: **Infection Causing Human Cancer**, Wiley-VCH, Germany, Pg. 145 – 176.
- Howley,P.M. *et al.*, (2001): Papillomaviridae and their Replication, In: Fields, B.N. & Knipe, D.M., (ed): **Field's Virology**, New York, Raven Press.
- Huschtscha, L.I. & 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> Acesso em: 17 de maio/2007.
- Kato, I., Santamaria, M., De Ruiz, P.A., *et al.*, (1995): Inter-observer variation in cytological and histological diagnoses of cervical neoplasia and its epidemiologic implication. **J Clin Epidemiol**, 48 (9): 1167 – 74.
- Keating, J.T., Cviko, A. , Riethdorf,S. *et al.*, (2001): Ki-67, Cyclin E and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for Humam Papilloma virus-related cervical neoplasia. **Am J Surg Pathol**, 25(7): 884-891
- Kellokosky, J.K., Syrjänen, S.M., Chang,F., *et al.*, (1992): Southern Blot Hubridization and PCR in detection of oral Human Papillomavirus (HPV) Infections in Women with Genital HPV Infections. **J Oral Pathol Med**, 21 (10): 459 – 464.
- Kjellberg, L., Wadell, G., Bergman *et al.*, (2000): Regular disappearace of the human papillomavirus genome after conization of cervical dysplasia by carbon dioxide laser. **Am J Obst Gynecol**, 183(5): 1238-1242.

- Klaes, L., Friedrich, T., Spitkovsky, D. *et al* (2001): Overexpression of p16<sup>INK4</sup> as a Specific Marker for Dysplastic and Neoplastic Epithelial Cells of The Cervix Uteri, **Int J Cancer**, 92: 276 – 284.
- Kisseljon, F., Sakharova, O. & Kondratjeva, T. (2008): Cellular and Molecular Biological Aspects of Cervical Intraepithelial Neoplasia. In: Jeon, K.W.: International Review of Cell and Molecular Biology, Elsevier, London, England, pg. 35 – 96.
- 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, 7<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, Cap.7, pag. 281 – 356.
- Kurman, R.J., Norris, H.J. & Wilkinson, E. (1992): **Atlas of Tumor Pathology – Tumors of the Cervix and Vulva**, AFIP, 3<sup>a</sup> ed., Washington, USA, fascículo 4, pag. 44 – 72.
- Kurman, R.J. & Solomon, D. (1994): **The Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic Diagnoses – Definitions, Criteria and Explanatory Notes for Terminology and Specimen Adequacy**, Springer, New York, USA.
- Kurman, R.J. (2004): **The Bethesda System: A Historical Perspective**. In: Solomon, D. & Nayar, R.: The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology – Definitions, Criteria and Explanatory Notes, Springer, New York, USA, pg. 5 – 8.
- Ledger, W.J., Jeremias, J.M.S., Witkin, S.S.: (2000) Testing for high-risk human papillomavirus types will become a standard of clinical care. **Am J Obst Gynecol**, 182(4): 860-865.
- Lin, A.W., Barradas, M., Stone, J.C. *et al*. (1998): Premature senescence involving p63 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. **Genes Dev.**, 12, 3008 – 3019.

- Lin, M.W., Ashfaq, R., Michalopoulos, E., *et al.* (2000): Molecular Papanicolaou tests in the twenty-first century: Molecular analyses with fluid-based Papanicolaou technology. **Am J Obstet Gynecol**, 183: 39 – 45.
- McIndoe, W.A., McClean, M.R., JONES ,R.W. *et al.*, (1984). The invasive potencial of carcinoma in situ of the cervix. **Obstet Gynecol**, 64: 451-456.
- 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.
- Molano, M., Muñoz, N., Francesci, S. *et al.*, (2003): Determinants of Clearance of Human Papillomavirus Infections in Colombian Women with Normal Cytology: A Population-based, 5-Year Follow-up Study, **Am J Epidemiol**; 158:486-494.
- Morgan, D.O. (2007): **The Cell-Cycle control system**. In: Morgan, D.O.: The Cell Cycle: Principles of Control, New Science Press, London, England, Pg. 28 – 57.
- Munro, J., Stott, F.J., Vousden, K.H. *Et Al.* (1999): Role Of The Alternative INK4a Proteins In Human Keratinocyte Senescence: Evidence For The Specific Inactivation Of P16<sup>ink4</sup> Upon Immortalization, **Cancer Research**, 59, 2516 – 2521.
- Murphy, N., Ring, M., Killalea, A.G. *et al* (2003): p16<sup>INK4</sup> as a Marker for Cervical Dyscaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep™ Smers, **Journal of Clinical Pathology**, 56: 56 – 63.
- Okada, M.M.G., Gonçalves, M.Ag. & Giraldo, P.C. (1999): Epidemiologia e Patogênese do Papillomavírus Humano (HPV), In: **I Consenso Brasileiro de HPV**, Editora BG cultural, cap.1, São Paulo.
- O'Shaughnessy, J.A., Kelloff, G.J., Gordon, G.B. *et al* (2002). Treatment and Prevention of Intraepithelial Neoplasia: An Important Target for Accelerated New Agent Development, **Clinical Cancer Research**, vol.8, 314 – 346.
- Ozgul, N., Cil, A.P., Usubutun, A. *et al.* (2008): Staining characteristics of p16<sup>INK4a</sup>: is there a correlation with lesion grade or high-risk human papilloma virus positivity? **J Obstet Gynaecol Res.**: 34(5):865-71.
- Papanicolaou, G.N. (1942): New procedure for staining vaginal smers. **Science**, 95:438 – 439.

- Reddel, R.R. (2000): The Role of Senescence and Immortalization in Carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 21 (3): 477 – 484.
- Rheinwald, J.G., Hahn, W.C. *et al.*, (2002) A Two-Stage, p16INK4a and p53-Dependent Keratinocyte Senescence Mechanism That Limits Replicative Potential Independent of Telomere Status. **Molecular and Cellular Biology**, Jul/2002, 22 (14): 5157 – 5172.
- Richardson, H., Ferenczy, A., Franco, E. *et al.* (2005): Modifiable Risk Factors Associated with Clearance of Type-Specific Cervical Human Papillomavirus Infections in a Cohort of University Students. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention** May 14; 1149
- Richart, R.M. (1990): A Modified Terminology for Cervical Intraepithelial Neoplasia, **Obst Gynecol**, 75:131 – 133.
- Rivoire, W., Rocha, M.L., Ramos, J.G., *et al.*,(1993): Neoplasias Malignas de Colo Uterino. In: Rivoire, W., Menke, C.H. e Freitas, F.(ed.) **Rotinas em Ginecologia**, Artes Médicas, 2ª edição, cap; 18, Porto Alegre.
- Romanos, M.T.V., Santos, N.S.O.O & Miranda, M.M.F.S., (2002). Viroses Oncogênicas. In: Santos, N.S.O, Romanos, M.T.V. & Wigg, M.D. **Introdução à Virologia Humana**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pág. 204 – 211.
- Rosa, M.I. (2007): O papilomavirus humano e lesões de colo uterino, tese de doutorado UFRGS. Disponível em <http://hdl.handle.net/10183/12119>.
- Rosai, J.: Female Reproductive System, (1996). In: **Ackerman`s Surgical Pathology**, Rosai, J. (ed), 8ª ed., Mosby, St. Loius/ USA, cap.19, pag. 1358 – 1360.
- Rubin, E. & Farber, J. (2002): **Patologia**, 3ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pg.225.
- Sankaranarayanan, R. & Wesley, R. (2003): A Practical Manual on Visual Screening for Cervical Neoplasia, IARC, France, Cap. 2 e 3.
- Sankaranarayanan, R. & Ferlay, J. (2006): Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, 20(2):207-25.
- Sano, T., Oyama, T., Kashiwabara,K. *et al.*, (1998): Expression Status of p16 Protein is Associated with Human Papillomavirus Oncogenic Potential in Cervical and Genital Lesions. **Am J Pathol**, 153: 1741-1748.

- Schiffman, M.H. (1995): New Epidemiology of Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute**, 87 (18):20: 1345 – 1347.
- Sedlacek, T.V.: (1999) Advances In The Diagnosis And Treatment Of Human Papillomavirus Infections. **Clin Obst Gynecol**, 42 (2): 206-220.
- Sedlacek, T.V.: (1999) Advances In The Diagnosis And Treatment Of Human Papillomavirus Infections. **Clin Obst Gynecol**, 42 (2): 206-220.
- Serrano, M., Lin, A.W., Mccurrach, M.E *et al.* (1997): Oncogenic *ras* provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16<sup>INK4</sup>. **Cell**, 88, 593 – 602.
- Shay, J.W. & Wright, W.E. (2004): Senescence and Immortalization Role of Telomeres and Telomerase. **Carcinogenesis**. 26 (5): 867 – 874.
- Sherr, C.J. (1996): Cancer Cells Cycles, **Science**, 274 (5293): 1672 – 1677.
- Smith, R.A., Cokkinides, V. & Brawley, O.W. (2009): Cancer screening in the United States, 2009: A review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening. **CA Cancer J Clin**; 59:27-41
- Solomom,D., Davey,D., Kurman, R., *et al.*,(2002): The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA**, 287: 2114 – 2119.
- Solomon, D & Nayar, R. (2004): **The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology – Definitions, criterias, and explanatory notes**. Springer, 2<sup>a</sup> ed., New York.
- 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.
- Torres, J.E. & Riopelle, M.A. (1993): History of Colposcopy in the United States. Chronology of Colposcopy Development Worldwide. **Obstet Gynecol Clin North Am**, 20 (1): 1 – 12.

- Tsutsui, T., Kumakura, S., Yamamoto, A., *et al.* (2002): Association of p16<sup>INK4</sup> and pRb inactivation with immortalization of human cells. **Carcinogenesis**, 23 (12): 2111 – 2117.
- Vale, D., Morais, S.S., Pimenta, A.L. *et al* (2010): Avaliação do rastreamento do câncer do colo do útero na Estratégia Saúde da Família no Município de Amparo, São Paulo, Brasil. **Cad Saúde Pública**, 26 (2).
- Van Der Graaf, Y., Molijn, A., Doornewaard, H. *et al.*, (2002) Human Papillomavirus and The Long-term Risk of Cervical Neoplasia, **Am J Epidemiol**, 156(2): 158-164.
- Villa, L.L. (1998): Aspectos Moleculares da Oncogênese por papilomavírus. In: Bibbo, M. & Moraes Filho, A.: **Lesões Relacionadas à Infecção por HPV no Trato Anogenital**, Revinter, 1ª edição, cap. 4, Rio de Janeiro.
- Yildiz, IZ, Usbutun, A., Firat, P. *et al* (2007): Efficiency of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the p16 literature. **Pathol Res Pract** ;203(6):445-9.
- Yuenyaou, P. & Ramirez, P.T. (2002): Preinvasive disease of the cervix. In: Boff, R.A. & Kavanagh, J.J. (ed.): **Ginecologia e Mastologia – Um Guia Prático**. EDUCS, 1ª edição, cap. 90, Caxias do Sul.
- Wieland,U. & Pfister, H. (1999): Infecção por Papilomavírus em Patologia Humana: epidemiologia, patogênese e papel oncogênico. In: Gross, G.E. & Barrasso, R.: **Papilomavírus Humano – Atlas Clínico de HPV**. ArtMed, 1ª edição, cap. 1, Porto Alegre.
- 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.
- Wright, T.C., Gatscha, R.M., Luff, R.D, *et al.*(2004): **Epithelial Cell Abnormalities: Squamous**. In: Solomon, D. & Nayar, R. (ed.) The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology, New York, Springer, 2ª ed., pg. 89 – 122.
- Zahm, D.M., Nindl, I. & Schneider,N.A. (1999): Princípios Gerais do Diagnóstico: detecção do papilomavírus humano. In: Gross, G.E. & Barrasso, R.:

**Papilomavírus Humano – Atlas Clínico de HPV.** ArtMed, 1ª edição, cap. 2, Porto Alegre.

Zeferino LC.(2008): The challenge of reducing mortality dueto cervical cancer. **Rev Bras Ginecol Obstet**; 30:213-5.

Zhu, J., Woods, D., McMahon, M., *et al.* (1998): Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. **Genes Dev.**, 12, 2997 – 3007.

## ANEXO 1

### **TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO E ESCLARECIDO PARA COLETA DE MATERIAL DO COLO UTERINO**

Sra. \_\_\_\_\_, o grupo de professores liderados pelo Prof. Eduardo Pretto Serafini, da Universidade de Caxias do Sul, está realizando pesquisa em lesões do colo uterino (útero) que podem estar sendo causadas por um vírus chamado Papilomavírus humano, ou HPV.

Esta pesquisa tem como objetivo estudar o comportamento e evolução das lesões de colo uterino causadas pelo HPV, bem como, identificar qual dos tipos de HPV ocorrem com maior frequência na nossa região, para que com estas informações, os profissionais da saúde possam orientar e tratar todos os acometidos por esta doença.

Gostaríamos de esclarecer que o HPV pode estar presente nas genitálias masculinas e femininas, sendo considerado fator de risco para o desenvolvimento de doenças que precedem o câncer de pênis, da vulva, da vagina e do colo uterino. Ou seja, o HPV tem sido considerado o causador destes tumores.

Para identificarmos o vírus é necessário que se faça a coleta de material diretamente das lesões, as quais posteriormente serão analisadas em laboratório. Esta coleta poderá causar dor de discreta intensidade e pequeno sangramento. Esta coleta deverá ser repetida a cada 6 meses, durante 2 anos.

A sua participação nesta pesquisa será mantida em sigilo. Somente os médicos envolvidos diretamente com a pesquisa é que saberão dos resultados, sendo sua privacidade

resguardada, não sendo relacionada com sua pessoa. Caso a presença de HPV-DNA seja detectada, a senhora será informada e a equipe médica utilizará tal dado para melhor tratamento e acompanhamento do seu caso.

Este exame não lhe trará despesas e a qualquer momento a senhora poderá se retirar do projeto, caso esta seja a sua vontade. Neste caso, seu acompanhamento será continuado pelos médicos, sem nenhum constrangimento.

O seu contato para qualquer dúvida será a Dra. Alessandra Guerra Godoy, através do telefone 3218-2100 ramal 2541 (Laboratório de Patologia – sala 507) ou poderá ser encontrada pela parte da tarde no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, localizado no bloco S da Universidade de Caxias do Sul.

Eu, \_\_\_\_\_ estou  
suficientemente esclarecida e autorizo as coletas de material do meu colo uterino com a finalidade de pesquisar a presença e comportamento do vírus HPV.

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_.

## ANEXO 2

(1º ARTIGO – SOBRE O MÉTODO UTILIZADO)

### MÉTODO QUANTITATIVO PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA p16INK4 EM LESÕES ESCAMOSAS INTRA-EPITELIAIS DO COLO UTERINO.

Alessandra Eifler Guerra Godoy, Eduardo Pretto Serafini, Fábio F. Pasqualotto

**RESUMO:** Os autores apresentam uma nova forma de quantificar a expressão da p16INK4 em casos de lesão escamosa intraepitelial do colo uterino. O objetivo é identificar subgrupos dentro do grupo formado pelas pacientes que desenvolvem lesão escamosa intraepitelial de baixo grau (LEIBG), na tentativa de discriminar as que merecem um tratamento mais agressivo, daquelas que podem ser apenas observadas. Ou seja, auxiliar no dilema de tratar ou não estas pacientes.

**ABSTRACT:** The authors present a new form to quantify the expression of p16INK4 in cases of squamous intraepithelial injury of the cervix uterine . The objective is to identify sub-groups of the group formed for the patients who develop squamous

intraepithelial injury of low degree (LSIL), in the attempt to discriminate the ones that they deserve a more aggressive treatment, of that only can be observed. That is, to assist in the quandary to treat or not these patients.

**PALAVRAS-CHAVES:** expressão da p16INK4, método quantitativo para p16INK4, p16INK4 em LEIBG e LEIAG.

**KEY WORDS:** p16INK4 expression, quantitative method for p16INK4, p16INK4 and Low SIL and High SIL.

A positividade da p16INK4 por imunohistoquímica em lesões escamosas intra-epiteliais do colo uterino tem sido descrita por diversos autores. A maioria dos pesquisadores tem demonstrado forte correlação da expressão da p16INK4 com NIC2/NIC3, entre 90 e 100% dos casos (Klaes, et al, 2001; Hu, et al, 2005; Bozzetti, et al, 2005). Este achado demonstra que o aparecimento de NIC2 e NIC3 está relacionado com descontrole do ciclo celular e por conseqüência superexpressão de algumas proteínas como a p16INK4.

Os mesmos pesquisadores têm encontrado índices variáveis de expressão da p16INK4 em lesões classificadas como NIC1 e HPV, com percentual de positividade variando entre 44 e 60% dos casos (Klaes, et al, 2001; Hu, et al, 2005). A grande dificuldade ao se analisar trabalhos sobre a expressão da p16INK4 em lesões de colo uterino está na grande variabilidade de métodos utilizados para graduar a coloração observada nas lâminas de imunohistoquímica. Diferentes autores estabelecem aleatoriamente pontos de corte para classificar os casos, conforme demonstrado na tabela 1. Isto faz com que casos considerados negativos por alguns autores sejam positivos para outros e vice-versa.

Autor	Método
Wang et al, 2004	Neg – até 20% de células coradas 1+ - marcação esporádica 2+ - marcação focal 3+ - marcação difusa
Sano et al, 1998	Neg – até 5% de células coradas < 80% - marcação fraca > 80% - marcação forte
Klaes et al, 2001	Neg - até 1% de células coradas < 5% - marcação esporádica < 25% - marcação focal > 25% - marcação difusa
Murphy et al, 2003,2005	Neg - 0 < 10% - 1 <50% - 2 > 50% - 3
Keating et al, 2001	Neg - até 5% de células coradas < 80% - marcação focal > 80% - marcação difusa
Agoff et al, 2003	Neg - 0 <25% - 1 < 75% - 2 > 75% - 3
Hu et al, 2005	Neg - 0 1 - marcação esporádica 2 - marcação focal 3 - marcação difusa

Tabela 1: formas de classificação para expressão da p16INK4 em colo uterino, utilizada por diversos autores.

Os métodos utilizados até o momento na literatura resumem-se a dois grupos. No primeiro grupo está o método binário simples, que apenas classifica os casos em positivo

ou negativo. No segundo grupo estão os métodos semi-quantitativos, que utilizam escalas, buscando agrupar casos dentro daqueles classificados como positivos. São utilizadas algumas designações tais como: negativo/marcação fraca/marcação forte; negativo/marcação esporádica/ marcação focal/marcação difusa; escala de cruces e escala por números, variando de 0 a 3. Estes métodos foram aplicados e mostraram-se, na nossa casuística, subjetivos e apresentaram grande variabilidade intra e interobservador. Apesar destas características indesejáveis, os métodos semi-quantitativos buscam diferenciar subgrupos dentro daqueles casos classificados como “positivos”. Isto seria especialmente interessante nos casos de NIC1 e HPV, visto que a expressão da p16INK4 poderia ser utilizada como ferramenta adicional da resolução do dilema entre tratar ou não tratar estas pacientes. Sabe-se que cerca da metade das pacientes com NIC1/HPV mostram alguma expressão para p16INK4 e que metade destas mostram forte expressão para este biomarcador.

Na tentativa de diminuir a subjetividade e conseguir uma melhor definição entre os grupos de lesão, elaboramos um método quantitativo absoluto para avaliar a expressão da p16INK4 nas lesões escamosas intra-epiteliais do colo uterino, buscando diferenciar, com maior precisão e menor subjetividade, pacientes dentro de um mesmo grupo. O método avalia o percentual de células neoplásicas coradas em relação ao total de células neoplásicas da lesão. O objetivo do desenvolvimento deste método é diminuir a subjetividade e propor uma alternativa que possa ser reproduzida por qualquer patologista, bastando apenas um microscópio com captura de imagens e uma impressora de boa qualidade. A reprodutibilidade do método faz com que possa ser utilizado em qualquer laboratório de patologia, visto sua possível utilidade clínica.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 144 casos de biópsias de colo uterino, embebidas em parafina, divididas em três grupos: grupo controle, grupo composto por pacientes com HPV/NIC1 e grupo composto por pacientes com NIC2/NIC3. O processo de imuno-histoquímica pelo sistema EnVision®, foi realizado utilizando-se o Cintec® p16INK4 Histology Kit (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark), conforme instruções do fabricante, com anticorpo primário p16INK4 rato anti-humano, clone E6H4.

Os cortes de 3µm, realizados em lâminas sialanizadas, foram contra-corados com hematoxilina de Mayer.

Cada caso foi analisado por dois médicos patologistas, em separado, com utilização de vários métodos. Utilizou-se o método binário (negativo/positivo), método semi-quantitativo com escala de cruces (0 / 1+ / 2+ / 3+) e método quantitativo de percentual. Este último foi proposto tomando-se como base os 4 melhores campos de grande aumento (400x) das lesões. Foram feitas 4 fotomicrografias por microscopia óptica, impressas em papel, das áreas afetadas pela neoplasia intraepitelial. Cada fotografia foi submetida a contagem manual das células neoplásicas coradas sobre o total de células neoplásicas, o que corresponde ao percentual de positividade para expressão da p16INK4.

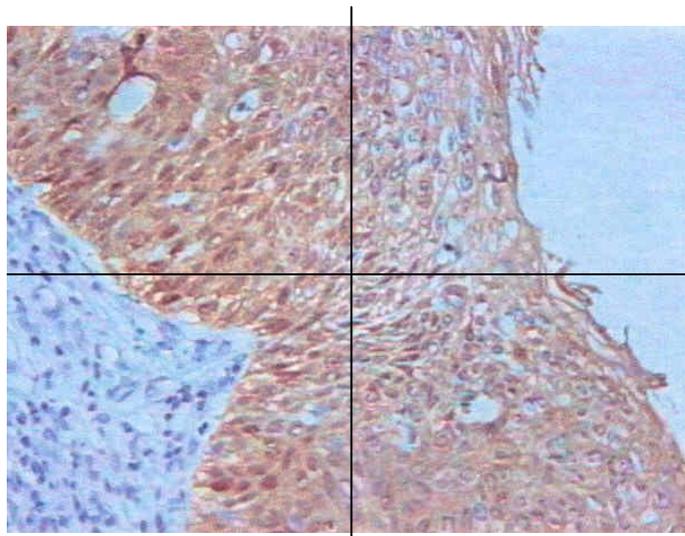


Fig.1: Fotomicrografia de um caso, mostrando positividade intensa para p16*INK4* (99%), dividida em quatro quadrantes, para a contagem de células (400x, imunohistoquímica, sistema EnVision, contracoloração com hematoxilina).

## RESULTADOS

O grupo controle constituído por 29 casos de cervicite crônica, mostrou ausência de expressão da p16*INK4* em todos os casos. Os grupos das lesões estavam assim constituídos: 62 casos de NIC1/HPV e 53 casos de NIC2/ NIC3. A positividade para p16*INK4* no universo das 144 pacientes foi de 55% dos casos (80 casos/144), utilizando-se o método binário. A distribuição em relação ao diagnóstico histopatológico, excetuando-se o grupo controle, está demonstrada na tabela 2, em números absolutos e percentuais. Considerando-se apenas as lesões intraepiteliais, a expressão de p16*INK4* foi positiva em 69,5% dos casos. A tabela 2 mostra, também, nítida diferença entre a expressão da

p16INK4 nas LEIBG (HPV / NIC 1), cuja média de positividade foi de 48,3% dos casos e nas LEIAG (NIC 2 e NIC 3), cuja média de positividade foi de 94,3% dos casos ( $p < 0,001$ ). A análise estatística destes dados por métodos não-paramétricos, mostra segundo o teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis, significativa diferença entre estes dois grupos.

	<b>1 LEIBG</b>		<b>2 LEIAG</b>	
	HPV	NIC 1	NIC 2	NIC 3
p16INK4	21 (18,2%)	11 (9,5%)	2 (1,7%)	1 (0,8%)
Negativa	<b>32 (56,7%) <math>P &lt; 0,689</math></b>		<b>3 (5,7%) <math>P &lt; 0,894</math></b>	
p16INK4	10 (16,5%)	11 (9,5%)	13 (11,3%)	37 (32,1%)
Positiva	<b>30 (48,3%)</b>		<b>50 (94,3%)</b>	

Tabela 2: Expressão da p16INK4 por imunohistoquímica relacionada ao diagnóstico histopatológico utilizando-se o método binário ( $n = 115$ ) ( $p < 0,001$  entre os grupos LEIBG e LEIAG).

Os métodos semi-quantitativo e por escore foram utilizados em conjunto, uma vez que, já na análise dos primeiros casos, demonstraram resultados bastante semelhantes, quando avaliados em separado. Ambos têm características semi-quantitativas, embora a utilização do método de escore vise diferenciar mais os grupos resultantes. Entretanto, ambos mostram-se subjetivos, sendo que as classificações 2+/3+ e 3+/3+ do método de escore correspondem a uma mesma classificação no método semi-quantitativo (fortemente positivo). Ambos são métodos subjetivos e mostraram grande variabilidade intra e interobservador neste estudo.

Apesar destas características indesejáveis, ambos buscam diferenciar subgrupos de casos dentro daqueles classificados como “positivos”, conforme pode ser observado na tabela 3. Especula-se se, casos classificados como fortemente positivos / 3+/3+, poderão ter evolução diferente daqueles classificados como fracamente positivos / 1+/3+. Isto seria especialmente interessante nas LEIBG, visto que a expressão da *p16INK4* poderia, eventualmente, ser utilizada como ferramenta adicional na resolução do dilema entre tratar ou não tratar pacientes com LEIBG, fazendo da *p16INK4* um biomarcador para progressão da doença.

	<b>LEIBG</b>		<b>LEIAG</b>	
	HPV	NIC 1	NIC 2	NIC 3
p16INK4 Negativa	21 (18,2%)	11 (9,5%)	2 (1,7%)	1 (0,8%)
p16INK4 Positiva 1+/3+	11 (9,5%)	7 (6,0%)	5 (4,3%)	4 (3,4%)
p16INK4 Positiva 2+/3+	4 (3,4%)	3 (2,6%)	4 (3,4%)	10 (8,6%)
p16INK4 Positiva 3+/3+	4 (3,4%)	1 (0,8%)	4 (3,4%)	23 (20%)
	<b>19/40</b>	<b>11/22</b> P<0,650	<b>13/15</b>	<b>37/38</b> P<0,789

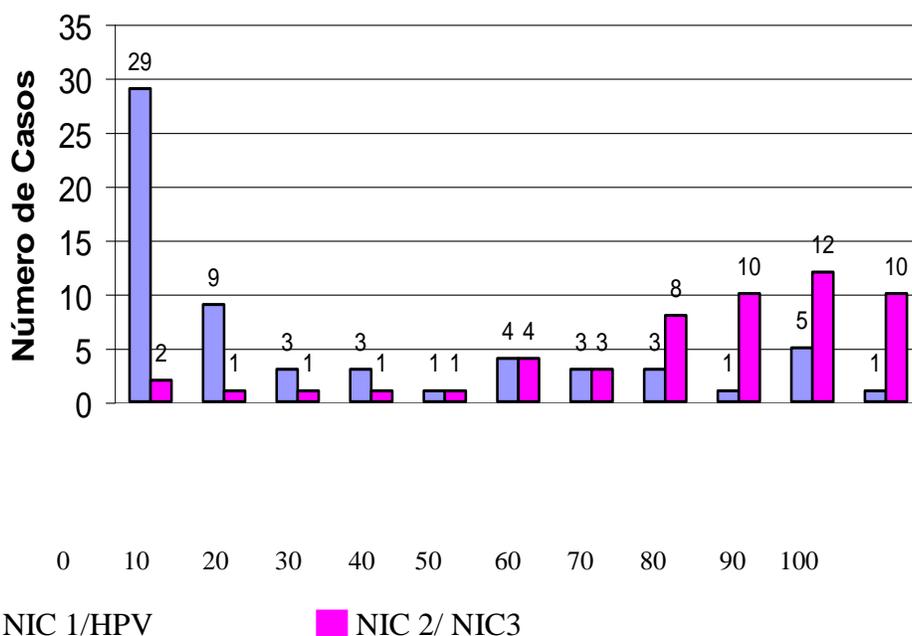
Tabela 3: Método semi-quantitativo e por escore para graduação da expressão da *p16INK4* por imunohistoquímica (n = 115) (p < 0,001 na comparação entre os grupos formados por LEIBG e LEIAG)

A tabela 3 demonstra que a intensidade da coloração pela p16INK4 tende a aumentar proporcionalmente à gravidade da lesão, vendo-se que em um extremo encontram-se as amostras com lesão ocasionada pela infecção pelo HPV, nas quais a expressão da p16INK4 foi negativa ou apenas fracamente positiva em 80% dos casos. No extremo oposto, estão as NIC 3, nas quais a expressão da p16INK4 foi fortemente positiva, 2+/3+ e 3+/3+ em 86% dos casos.

Isto traduz uma significativa relação entre o grau da lesão e a intensidade da expressão da p16INK4 com  $p < 0,001$  pelo teste de Kruskal-Wallis.

O método quantitativo de percentual de células coradas foi utilizado na tentativa de diferenciar, com maior precisão e menor subjetividade, pacientes dentro de um mesmo grupo. A revisão da literatura não mostrou a utilização deste método em colo uterino. Este não era um objetivo proposto no início do projeto. Entretanto, a análise dos resultados, através dos métodos descritos na literatura, mostrou dados subjetivos e com baixa especificidade, uma vez que se mostram positivos em um grande número de casos. Além disso, sabe-se que dentro do grupos de pacientes que desenvolvem infecção pelo HPV e NIC1, uma parte delas vai eliminar completamente a lesão e outra parte irá evoluir para uma lesão de alto grau (NIC2/NIC3).





Graf. 2 Distribuição dos casos conforme a percentual de células positivas para a p16INK4, relacionada aos grupos de diagnóstico histopatológico.

Num primeiro momento, as lesões foram divididas em 4 grupos segundo a classificação de Richart, a saber: efeito do HPV, NIC1, NIC2 e NIC3. Entretanto, as primeiras análises dos resultados da expressão da p16INK4 mostraram não haver diferença significativa quando se comparou HPV e NIC1. O mesmo aconteceu na comparação entre NIC2 e NIC3. Sendo assim, os quatro grupos iniciais de lesão foram reduzidos a apenas dois: um formado pelas lesões HPV/NIC1 e outro pelas lesões NIC2 e NIC3.

A análise do gráfico 2, mostra, primeiramente, que a distribuição das percentagens de células coradas desenha curvas inversamente proporcionais. O grupo das lesões constituídas por NIC1 e HPV apresenta uma grande parcela de casos negativos, sendo que 60% delas possuem positividade menor que 50% de células neoplásicas coradas.

Entretanto, 40% dos casos de NIC1/HPV mostram forte positividade para p16INK4, com algumas amostras chegando a 100% de células coradas.

O inverso ocorre quando se analisa o grupo das NIC2/ NIC3. Neste grupo há pouquíssimos casos (6) que tenham mostrado negatividade para p16INK4 ou positividade menor que 50% de células coradas, o que representa 11,3% dos casos de NIC2/ NIC3. Isto significa dizer que 88,6% dos casos de NIC2/NIC3 são positivos para p16INK4 com percentagens acima de 50% de células neoplásicas coradas, entre os quais se observa grande quantidade de casos com 100% de células expressando a p16INK4, confirmando, mais uma vez, a forte relação da expressão desta proteína com o grau da lesão.

## DISCUSSÃO

A aplicação do método quantitativo foi decisiva para determinar a forte relação da expressão da proteína p16INK4 com as lesões de alto grau, sendo que em muitas delas, observou-se 100% das células neoplásicas coradas. Tal achado não pode ser comparado com os achados de outros autores, uma vez que os termos utilizados são subjetivos (ex.: marcação forte).

Além disso, aplicando todos os métodos na mesma casuística, observou-se que várias amostras trocaram de grupo. Por exemplo, utilizando-se um método semiquantitativo, uma determinada amostra foi classificada como fracamente positiva para p16INK4 e aplicando-se o método de percentual, observou-se que 80% das células neoplásicas estavam coradas. Isto mostra que a característica subjetiva dos métodos semiquantitativos tende a influenciar o observador a subavaliar cada amostra.

Frente a estes achados, questiona-se qual o significado para estas mulheres, cujas amostras atingiram elevados percentuais de expressão da p16INK4. Teriam elas vírus mais agressivos que as demais? A evolução da sua doença seria mais rápida? Ou, ainda, estes

resultados representam que estas pacientes, mesmo tendo lesões morfológicamente características de NIC1/HPV, já teriam alterações moleculares que fariam seu comportamento biológico evolutivo ser semelhante aos de uma NIC2/NIC3? A simples positividade da p16<sup>INK4</sup> nas lesões não é suficiente para discriminar grupos. Este achado pode indicar que não basta apenas diagnóstico qualitativo (positivo ou negativo), mas pode ser importante um diagnóstico quantitativo. A utilização de método quantitativo de percentual nas lesões pré-neoplásicas do colo uterino novamente foi decisiva, mostrando claramente a existência de dois subgrupos dentro das lesões classificadas como NIC1 e HPV positivas para p16<sup>INK4</sup>. Um deles é formado pelos casos que mostraram positividade em menos de 50% de células e o outro são aquelas que demonstraram positividade maior que 50% de células neoplásicas coradas, à semelhança do que ocorre com o grupo formado pelas lesões classificadas como NIC2 e NIC3. Esta discriminação não encontra par na literatura. Estes achados preliminares nos levam a crer que a p16<sup>INK4</sup> possa ser não apenas um marcador de lesão de alto grau, mas um marcador de progressão tumoral. Este achado, caso confirmado, poderia ser extremamente útil na resolução do dilema de tratar ou não pacientes portadoras de lesão de baixo grau.

Entretanto, ainda é necessário estudo de seguimento de pacientes, principalmente no que se refere ao grupo formado pelas lesões classificadas como NIC1/HPV, cuja expressão da p16<sup>INK4</sup> foi acima de 50% das células neoplásicas, por vezes chegando a 100%, como observado nas lesões classificadas como NIC2/NIC3. Ainda não se sabe o que significa este achado no grupo de pacientes com NIC1/HPV. Especula-se que possa estar relacionado à persistência da infecção por vírus de alto risco oncogênico.

## BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Hu, L., Guo, M., He, Z. *et al.*, (2005): Human Papillomavirus Genotyping and p16INK4 Expression in Cervical Intraepithelial Neoplasia of Adolescents, **Mod Pathol**, 18 (2): 267 – 73.
3. Bozzetti, M.C., Mylius, L.C., Meurer, L. *et al.*, (2005): p16INK4 Expression and Human Papillomavirus Infection in Cervical Intraepithelial Lesions and Epidemiological Aspects. In: **22<sup>nd</sup> International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop**, Book of Abstracts, Canada.
4. Wang, J., Zheng, B., Li, X., *et al.*(2004): Predictive Significance of the Alterations of p16INK4A, p14ARF, p53 and Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in the Progression of Cervical Cancer. **Molecular Oncology**, 10: 2407 – 2414.
5. Sano, T., Oyama, T., Kashiwabara, K. *et al.*, (1998) Expression Status of p16 Protein is Associated with Human Papillomavirus Oncogenic Potential in Cervical and Genital Lesions. **Am J Pathol**, 153: 1741-1748
6. Murphy, N., Ring, M., Killalea, A.G. *et al* ( 2003): p16INK4 as a Marker for Cervical Dyscaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep™ Smers, **Journal of Clinical Pathology**, 56: 56 – 63.

7. Keating, J.T., Cviko, A. , Riethdorf,S. *et al.*, (2001): Ki-67, Cyclin E and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for Humam Papilloma virus-related cervical neoplasia. **Am J Surg Pathol**, 25(7): 884-891
8. Agoff, S.N., Lin, P., Morihara, J. *et al.*, (2003): p16INK4A 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.

ANEXO 3

DOCUMENTAÇÃO REFERENTE A PATENTE COM ATRIBUIÇÃO DE NÚMERO  
RELACIONADA AO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA p16*INK4*.