

TAISE PALMEIRAS DE FREITAS

TIPAGEM MOLECULAR DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO E  
ESTUDO IMUNOCITOQUÍMICO DA P16<sup>INK4A</sup> EM PACIENTES  
COM E SEM LESÕES ESCAMOSAS INTRA-EPITELIAIS E  
INVASORAS DE COLO UTERINO.

Belo Horizonte

Faculdade de Farmácia da UFMG

2007

TAISE PALMEIRAS DE FREITAS

TIPAGEM MOLECULAR DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO E  
ESTUDO IMUNOCITOQUÍMICO DA P16<sup>INK4A</sup> EM PACIENTES  
COM E SEM LESÕES ESCAMOSAS INTRA-EPITELIAIS E  
INVASORAS DE COLO UTERINO.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Paula Ávila Fernandes

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Ana Paula Salles Moura Fernandes

Belo Horizonte

Faculdade de Farmácia da UFMG

2007

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Moacir e Ilda, que sempre me apoiaram e me ajudaram nos estudos.  
Obrigada por todo amor, estímulo e renúncias que fizeram por mim.

Às minhas irmãs, Priscilla e Lídia, obrigada pela amizade e companheirismo.

.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que me deu a vida e a oportunidade de realizar esse trabalho, que me deu força para concluí-lo e que está sempre comigo em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Paula Ávila Fernandes, pela disponibilidade, disposição para me orientar neste trabalho e por todo o apoio oferecido sempre que precisei.

À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Ana Paula Salles Moura Fernandes, que me orientou com muita dedicação.

Ao colega e amigo Mateus Muniz Rodrigues, pela ajuda oferecida durante a realização deste trabalho.

Ao Jarbas Eustáquio Cardoso, pela ajuda sempre oferecida no Laboratório, com sua experiência e dedicação.

Aos médicos Dr<sup>a</sup> Maria de Fátima D. S. Brito, Dr<sup>a</sup> Vera Lúcia Furtado, Dr. Lúcio, Dr<sup>a</sup> Silvana Cló e Dr. George, obrigada pela dedicação em coletar as amostras de suas pacientes, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.

A todas as pacientes que concordaram em participar voluntariamente deste estudo.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular, que sempre colaboraram comigo durante a realização deste trabalho.

À toda minha família, que sempre torceu por mim.

Ao Prof. Ivan Sampaio e João Paulo Haddad da Escola de Veterinária da UFMG e à Poliana La Rocca, pela orientação na análise estatística.

Aos alunos e colegas da Unifenas, pelo convívio e aprendizado.

A todos os professores e funcionários do Programa de pós-graduação da Faculdade de Farmácia da UFMG que acompanharam a realização deste trabalho.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de Papilomavírus Humano (HPV) e de seus subtipos virais 16 e 18, através da técnica de reação em cadeia da polimerase, em pacientes com e sem lesão escamosa intraepitelial e neoplasia invasora do colo uterino, diagnosticadas ao exame citopatológico, e correlacionar estes resultados com a expressão imunocitoquímica da proteína p16<sup>INK4A</sup> em esfregaços cervicais. Foram analisadas 129 amostras cervicais de pacientes provenientes de dois serviços públicos de Belo Horizonte-MG, Brasil. O índice de detecção de HPV foi maior (91,5%) nas amostras com diagnóstico citológico positivo. A detecção de HPV -16 ou HPV-18 foi verificada em 70,83% das amostras com lesão escamosa intraepitelial de alto grau (LAG)/carcinoma invasor, em 40% das amostras com lesão escamosa intraepitelial de baixo grau (LBG) e em 50% dos casos de células escamosas atípicas de significado indeterminado/células glandulares atípicas de significado indeterminado (ASCUS/AGUS). Dentre as amostras em que foi detectado HPV-18, 44,4% apresentaram imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup>. Para as amostras com HPV-16, HPV não determinado e HPV negativo, essa positividade foi de 28,6%, 25,9% e 17,6%, respectivamente, não se constatando associação estatisticamente significativa entre a imunorreatividade para p16<sup>INK4A</sup> e os tipos virais de alto risco oncogênico pesquisados neste trabalho. A imunorreatividade para p16<sup>INK4A</sup> foi detectada em 47,8% das amostras com LAG, em 26,7% naquelas com LBG, em 25% com ASCUS/AGUS e em 16% das amostras com diagnóstico citopatológico negativo, havendo associação estatisticamente significativa entre a expressão aumentada da p16<sup>INK4A</sup> e a presença de LAG ( $p < 0,01$ ;  $OR = 4,813$ ;  $IC^{OR95\%} = 1,580-14,661$ ).

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the presence of Human Papillomavirus (HPV) and of the viral types HPV-16 and HPV-18 with the polymerase chain reaction methods in patients with and without squamous intraepithelial lesion or invasive cervical cancer and to correlate these results with the p16<sup>INK4A</sup> immunocytochemical overexpression on cervical smears. Cervical samples of 129 patients from two public health of Belo Horizonte-MG, Brazil were evaluated. The DNA-HPV detection rate was significantly higher (91,5%) in positive cytopathological samples. HPV-16 or HPV-18 detection were seen in 70,83% of the high grade squamous intraepithelial lesions (HSIL)/invasive carcinoma samples, in 40% of the low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) samples and in 50% of the atypical squamous cells of undetermined significance/atypical glandular cells of undetermined significance (ASCUS/AGUS) samples. Among the samples with HPV-18, 44,4% showed p16<sup>INK4A</sup> immunocytochemical overexpression. The p16<sup>INK4A</sup> overexpression was 28,6%, 25,9% e 17,6% among HPV-16, undetermined HPV and negative HPV samples, respectively. There was no significant statistic association between p16<sup>INK4A</sup> overexpression and the high oncogenic viral types search in this work. The p16<sup>INK4A</sup> immunocytochemical overexpression was detected in 47,8% of the HSIL samples, in 26,7% of the LSIL, in 25% of the ASCUS/AGUS and in 16% of the negative cytological samples. There was significant statistic association between p16<sup>INK4A</sup> immunocytochemical overexpression and the presence of HSIL ( $p < 0,01$ ;  $OR = 4,813$ ;  $IC^{OR95\%} = 1,580-14,661$ ).

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AGUS	<i>Atypical glandular cells of undetermined significance</i> (Células glandulares atípicas de significado indeterminado)
ASCUS	<i>Atypical squamous cells of undetermined significance</i> (Células escamosas atípicas de significado indeterminado)
CDK	<i>Cyclin dependent Kinase</i> (Cinase dependente de ciclina)
CTR-DIP	Centro de Treinamento e Referência de Doenças Infecciosas e Parasitárias
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	Desoxirrinonucleotídeo trifosfato
E	<i>early</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papilomavírus Humano
IC	Intervalo de Confiança
INCA	Instituto Nacional de Câncer
kb	kilobase
kD	Kilodalton
L	<i>late</i> .
LAG	Lesão escamosa intra-epitelial de alto grau
LBG	Lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau
LEI	Lesão escamosa intra-epitelial



mL	mililitro
μL	microlitro
NIC I	neoplasia intra-epitelial cervical I
NIC II	neoplasia intra-epitelial cervical II
NIC III	neoplasia intra-epitelial cervical III
NUPAD	Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico
OR	<i>Odds Ratio</i>
pb	pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-EIA	PCR-ensaio imunoenzimático
pRb	proteína do retinoblastoma
qsp	quantidade suficiente para
RFLP-PCR	<i>Restriction DNA Fragment of Length Polymorphic – PCR</i> (Polimorfismos de Tamanho gerados por Fragmentos de Restrição de Produtos de PCR)
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
SDS	duodecil sulfato de sódio
URR	<i>upstream regulatory region</i> (região acima da região codificadora que regula a expressão do gene)

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Etapas de controle do ponto de transição G1-S do ciclo celular.	29
FIGURA 2 - Esquema representativo da expressão aumentada de p16 <sup>INK4A</sup> em células infectadas pelo HPV.....	31
FIGURA 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado pelo nitrato de prata, apresentando o produto de PCR do gene da $\beta$ globina humana.....	55
FIGURA 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado pelo nitrato de prata, apresentando o produto de PCR- HPV.....	57
FIGURA 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado pelo nitrato de prata, apresentando o produto de PCR- HPV16.....	59
FIGURA 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado pelo nitrato de prata, apresentando o produto de PCR- HPV18.....	60
FIGURA 7 - Fotomicrografia de esfregaço cervical apresentando célula escamosa com alteração compatível com ASCUS. Coloração de Papanicolaou, 400X.....	62
FIGURA 8 - Fotomicrografia de esfregaço cervical apresentando um coilócito no centro do campo (LBG). Coloração de Papanicolaou, 400X.....	63
FIGURA 9 - Fotomicrografia de esfregaço cervical apresentando células escamosas, com aumento da relação núcleo/citoplasmática, compatível com LBG. Coloração de Papanicolaou, 400X.....	63

FIGURA 10 - Fotomicrografia de esfregaço cervical apresentando um grupamento de células escamosas atípicas, compatível com LAG. Coloração de Papanicolaou, 400X.....	64
FIGURA 11 - Fotomicrografia de esfregaço cervical apresentando imunorreatividade negativa para p16 <sup>INK4A</sup> em grupamento de células com alteração compatível com LAG, 400X.....	66
FIGURA 12 - Fotomicrografia de esfregaço cervical apresentando imunorreatividade positiva para p16 <sup>INK4A</sup> em grupamento de células com alteração compatível com LAG, 400X.....	67
FIGURA 13 - Fotomicrografia de esfregaço cervical apresentando imunorreatividade positiva forte para p16 <sup>INK4A</sup> em célula com alteração compatível com LAG, 400X.....	68
FIGURA 14 - Fotomicrografia de esfregaço cervical apresentando imunorreatividade fraca para p16 <sup>INK4A</sup> em célula com alteração compatível com LAG, 400X.....	68
FIGURA 15 - Fotomicrografia de esfregaço cervical apresentando imunorreatividade esporádica para p16 <sup>INK4A</sup> em um agrupamento de células endocervicais, 400X.....	69

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Condições de temperatura das reações de PCR.....	50
TABELA 2 - Comparação entre dois protocolos de extração de DNA e entre os oligonucleotídeos MY09/MY11 e GP5+/GP6+ para a detecção de DNA-HPV.....	58
TABELA 3 - Resultados citopatológicos nos dois grupos estudados .....	62
TABELA 4 - Resultados moleculares nos dois grupos estudados.....	65
TABELA 5 - Correlação entre os resultados citopatológicos e moleculares	70
TABELA 6 - Correlação entre as categorias diagnósticas ao exame citopatológico e a detecção molecular de HPV.....	70
TABELA 7 - Correlação entre os resultados citopatológicos e os HPV's 16 e 18.....	71
TABELA 8 - Correlação entre a Imunorreatividade para p16 <sup>INK4A</sup> e as categorias diagnósticas ao exame citológico.....	73
TABELA 9 - Correlação dos achados citopatológicos, moleculares e imunocitoquímicos.....	75

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Correlação entre os resultados citopatológicos e os HPV 16 e 18.....	72
GRÁFICO 2 - Correlação entre a Imunorreatividade para p16 <sup>INK4A</sup> e as categorias diagnósticas ao exame citológico.....	74
GRÁFICO 3 - Correlação entre a imunorreatividade para p16 <sup>INK4A</sup> e os tipos de HPV's pesquisados.....	77

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
2.1 INFECÇÃO POR HPV.....	18
2.2 A INFECÇÃO POR HPV E AS LESÕES ESCAMOSAS INTRA-EPITELIAIS E INVASORAS DO COLO UTERINO.....	20
2.3 EXPRESSÃO IMUNOCITOQUÍMICA DA p16 <sup>INK4A</sup> EM LESÕES ESCAMOSAS INTRA-EPITELIAIS E INVASORAS DO COLO UTERINO...	28
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	42
3.1 OBJETIVO GERAL.....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA.....	44
4.2 COLETA DAS AMOSTRAS.....	45
4.3 ANÁLISE CITOPATOLÓGICA.....	46
4.4 ANÁLISE MOLECULAR.....	47
4.5 ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA.....	51
4.6 CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES REALIZADAS..	52
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
<b>5 RESULTADOS</b> .....	55
5.1 PADRONIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR GERAL PARA DETECÇÃO DO HPV.....	55

5.2 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR ESPECÍFICA PARA OS HPVS 16 E 18.....	58
5.3 ACHADOS CITOPATOLÓGICOS, MOLECULARES E IMUNOCITOQUÍMICOS.....	61
5.4 ACHADOS CITOPATOLÓGICOS .....	61
5.5 ACHADOS MOLECULARES.....	64
5.6. ACHADOS IMUNOCITOQUÍMICOS.....	65
5.7 CORRELAÇÃO ENTRE OS ACHADOS CITOPATOLÓGICOS, MOLECULARES E IMUNOCITOQUÍMICOS.....	69
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
6.1 PADRONIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA PCR.....	78
6.2 ACHADOS CITOPATOLÓGICOS .....	79
6.3 ACHADOS MOLECULARES.....	81
6.4 ACHADOS IMUNOCITOQUÍMICOS.....	86
6.5 CORRELAÇÃO ENTRE OS ACHADOS CITOPATOLÓGICOS, MOLECULARES E IMUNOCITOQUÍMICOS.....	87
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>95</b>
<b>8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>97</b>
<b>9 APÊNDICES.....</b>	<b>107</b>
<b>10 ANEXO.....</b>	<b>110</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer cervical é uma das doenças mais freqüentes entre mulheres e causa considerável morbidade e mortalidade. É o segundo câncer mais comum entre as mulheres no mundo, fazendo cerca de 400.000 novas vítimas a cada ano. Nos países desenvolvidos, há um declínio na incidência e mortalidade, enquanto nos países em desenvolvimento, há um padrão mais estável ou até mesmo um aumento na incidência (MOTOYAMA et al., 2004; TJALMA et al., 2005).

Os países da América Latina estão entre aqueles com maior incidência de câncer cervical no mundo (ARROSSI et al., 2003). No ano de 2000, 76.000 casos de câncer cervical e cerca de 30.000 mortes foram estimados para a região da América Latina.

No Brasil, em contraste com o observado nos países desenvolvidos, a mortalidade por câncer cervical ainda é alta. Estima-se que o câncer do colo do útero seja o terceiro tipo mais comum de neoplasia maligna e a quarta causa de morte por câncer na população feminina. Para 2006, estimou-se a ocorrência de 19260 novos casos de câncer cervical no Brasil (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA, 2006).

O câncer cervical está intimamente relacionado com a infecção persistente por certos tipos de Papilomavírus Humano (HPV). Em estudo realizado com amostras de biópsias cervicais de pacientes de 22 países, encontrou-se, através do uso da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), ácido desoxiribonucléico (DNA) de HPV em 99,7% dos casos de câncer cervical, indicando que o HPV é de fato a principal causa deste tipo de câncer (MUNOZ, 2000).



Tipos específicos de HPV apresentam riscos relativos diferentes para o desenvolvimento do câncer cervical. Sendo assim, a tipagem do HPV é importante para o prognóstico das lesões epiteliais do colo uterino (CASTLE et al., 2005; KHAN et al., 2005). Os tipos de HPV de alto risco mais prevalentes que infectam a cérvix uterina são: HPV 16 (53%), HPV 18 (15%), HPV 45 (9%), HPV 31 (6%) e HPV 33 (3%) (MUNOZ, 2000). Em estudos brasileiros, o HPV 16 é o mais freqüente em todas as regiões do país, entretanto, há variação com relação aos outros tipos. O HPV 18 é o segundo mais prevalente nas regiões Norte, Sul e Sudeste. Os HPVs 31 e 33 correspondem ao segundo tipo de HPV mais prevalente nas regiões Nordeste e Central, respectivamente (BOSCH et al., 1995; ELUF NETO et al., 1994; LORENZATO, F. et al., 2000; NORONHA et al., 1999; SANTOS et al., 2003).

Em Belo Horizonte, Borges et al. (2004) verificaram que a taxa de detecção de HPVs de alto risco oncogênico isoladamente ou associados a HPVs de baixo risco, pesquisada através da técnica de Captura Híbrida II, variou de 85% a 100% em 110 pacientes com lesão escamosa intra-epitelial (LEI) do colo uterino que participaram do estudo. Ainda em Belo Horizonte, Souza et al. (2001) estudando 49 pacientes positivas para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), encontraram HPVs de alto risco presentes em 15 dos 16 casos de displasia cervical. Em apenas 1 caso a displasia esteve relacionada à HPV de baixo risco.

Diversos marcadores têm sido estudados com a intenção de identificar as pacientes com maior risco para o desenvolvimento do câncer cervical. Há evidências recentes de que a infecção por HPV é acompanhada por mudanças na função ou nível de expressão de genes do hospedeiro.

Um dos marcadores que tem sido estudado é a proteína p16<sup>INK4A</sup>, que consiste em um produto de gene supressor de tumor que participa de etapas do ciclo celular.

Recentes estudos têm mostrado uma expressão aumentada da proteína p16<sup>INK4A</sup> em casos de neoplasia cervical. Vários tumores não associados ao HPV apresentam inativação da proteína p16<sup>INK4A</sup> através de deleção homozigota e hipermetilação do promotor, o que leva à atividade aumentada de cinase dependente de ciclina (CDK) e inativação da proteína do retinoblastoma (pRb) (KANAOKA et al., 2004).

Considerando a grande variabilidade intra e interobservador associada à interpretação citológica das lesões cervicais pré-neoplásicas e neoplásicas, a utilização de marcadores complementares, como a p16<sup>INK4A</sup>, pode ser importante na identificação de pacientes portadoras de HPVs de alto risco para o desenvolvimento de neoplasia cervical (SAQI et al., 2002).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 INFECÇÃO POR HPV

A infecção por HPV é a doença sexualmente transmissível mais comum, sendo que mais de 80% da população apresenta-se infectada em algum momento da vida. Na maioria dos casos, a infecção por HPV é assintomática e o vírus desaparece espontaneamente em 6-18 meses. Em raros casos, esta infecção leva ao câncer cervical (FERENCZY; FRANCO, 2002; TJALMA et al., 2005).

Amrani et al. (2003) detectaram, por meio da PCR, a ocorrência de HPV em 6% das amostras cervicais colhidas de pacientes sem alteração cervical prévia, provenientes de diferentes consultórios ginecológicos na Espanha.

Em um estudo realizado com pacientes oriundas de um programa de rastreamento para o câncer cervical em Porto Alegre, Brasil, foi encontrada uma prevalência de HPV de 15 %, quando utilizada a técnica de Captura Híbrida, e de 16 % quando utilizada a técnica de PCR. Quando combinadas as duas técnicas, a prevalência de HPV foi de 27 % (NONNENMACHER et al., 2002).

O HPV é caracterizado por apresentar dupla fita de DNA e um capsídeo icosaédrico (RIVOIRE et al., 2001). O genoma do HPV contém aproximadamente 8 Kilobases (Kb) de extensão. Seus genes dividem-se em três grupos funcionais: a região conhecida como *upstream regulatory region* (URR) (região acima da região codificadora que regula a expressão do gene), os genes *early* (E) e os genes *late*

(L). A região URR é uma região não codificadora do vírus cuja função é regular a transcrição e replicação viral. A região E é responsável pela síntese de proteínas relacionadas à replicação viral e que podem também interferir no ciclo celular, contribuindo para o desenvolvimento de neoplasias. São sete genes E, os quais têm diferentes funções: Os genes E1 e E2 codificam proteínas que regulam a transcrição de outros genes E; a região E4 codifica um grupo de proteínas que regula a maturação e replicação viral, além de interagir com proteínas da célula hospedeira, alterando a matriz de citoqueratina para produzir o coilócito; as proteínas E6 e E7 interagem com proteínas do hospedeiro, que possibilitam a transformação neoplásica das células infectadas pelo vírus (RICHART et al., 1998).

A região L possui dois genes: L1 e L2, os quais codificam proteínas do capsídeo viral. A proteína codificada pelo gene L1 é altamente conservada entre os diferentes tipos de HPV. A L2 é variável e responsável pelas diferenças de antigenicidade (RICHART et al., 1998).

Existem mais de cem tipos de HPVs identificados, sendo que mais de quarenta tipos causam infecções anogenitais, dos quais aproximadamente quinze são oncogênicos (SCHIFFMAN; CASTLE, 2003). Estes vírus estão associados a diferentes doenças em humanos, incluindo verrugas comuns e genitais, carcinoma esofágico, laríngeo e cervical, carcinoma de cabeça e pescoço (HUBBARD, 2003; RIVOIRE et al., 2001). Os HPVs podem ser classificados em grupos de alto risco (HPVs 16, 18, 45 e 56), risco intermediário (HPVs 31, 33, 35, 51, 52 ) e baixo risco (HPVs 6, 11, 42, 43 e 44) de acordo com a possibilidade de induzir o desenvolvimento de lesões malignas (RICHART et al., 1998).

Os tipos virais mais representativos entre aqueles de baixo risco oncogênico são 6 e 11 e aqueles de alto risco são 16 e 18, 31 e 45. Os HPVs de baixo risco

causam verrugas genitais benignas e não têm potencial oncogênico, enquanto os HPVs de alto risco são os agentes causadores do câncer cervical e de suas lesões precursoras (FERENCZY; FRANCO, 2002). Dentre os HPVs de alto risco oncogênico, HPV 16 e 18 são os mais associados a carcinoma cervical. O HPV 16 tem sido encontrado em mais de 50% dos carcinomas de células escamosas, enquanto o HPV 18 tem sido encontrado em mais de 50% dos adenocarcinomas (MOTOYAMA et al., 2004).

## 2.2 A INFECÇÃO POR HPV E AS LESÕES ESCAMOSAS INTRA-EPITELIAIS E INVASORAS DO COLO UTERINO

O HPV, ao penetrar na célula do hospedeiro, pode se apresentar de forma não integrada ao genoma celular (forma epissomal) ou integrar-se ao cromossomo da célula hospedeira. A integração geralmente é observada nos HPVs de alto risco, enquanto que os HPVs de baixo risco permanecem de forma epissomal (CRUM, 2000; FERENCZY; FRANCO, 2002; RIVOIRE et al., 2001).

A integração viral ao genoma do hospedeiro é central no processo de transformação celular e desenvolvimento de neoplasia cervical. Quando ocorre a integração viral, há interrupção da região E2 do HPV, resultando em perda da sua função supressora sobre os genes E6/E7. Os produtos dos genes E6 e E7 dos HPVs de alto risco, mas não dos HPVs de baixo risco, funcionalmente inativam os produtos de dois importantes genes supressores de tumor, as proteínas p53 e pRb,

respectivamente. Sendo assim, os genes E6 e E7 atuam como oncogenes (FERENCZY; FRANCO, 2002).

Em condições normais, os produtos dos genes supressores de tumor p53 e pRb são expressos sempre que as células apresentam algum dano no DNA ou quando as células são forçadas a entrar em um estado replicativo. A p53 promove parada do ciclo celular na fase G1, reparo e apoptose no DNA, evitando que células com erro no DNA entrem na fase S (LODISH et al., 2004). Sendo assim, as proteínas p53 e pRb são essenciais para o controle do crescimento normal das células, pois evitam a formação de células anormais e sua entrada no ciclo celular (FERENCZY; FRANCO, 2002).

Os membros da família do HPV não se desenvolvem em meios de cultura *in vitro*; sendo assim, a detecção de HPV depende estritamente de análises moleculares da seqüência do seu DNA. Há essencialmente 3 tipos de métodos de hibridização de ácido nucléico para detectar HPV: métodos de sonda direta de ácido nucléico, amplificação de sinal de hibridização e amplificação alvo. Dentre os métodos de sonda direta de ácido nucléico, a técnica padrão ouro para a análise do genoma do HPV é *Southern blot*. Outro método dentre estes é a Hibridização *in situ* que, utilizando sondas, avalia a presença de um ácido nucléico alvo ou a expressão de um gene, podendo ser correlacionado com os aspectos histopatológicos. Estes testes apresentam desvantagens como baixa sensibilidade, tempo longo para realização e utilização de quantidade elevada de DNA purificado (HUBBARD, 2003).

Dentre os métodos de amplificação de sinal está a Captura Híbrida, com maior sensibilidade em relação aos testes de sonda direta. No teste de Captura Híbrida, sondas de Ácido ribonucléico (RNA) específicas são dirigidas às seqüências de DNA e um anticorpo detecta esse híbrido. O híbrido reage com um anticorpo

conjugado e é detectado com um substrato quimioluminescente. Este método não permite a identificação do tipo específico do HPV, permitindo apenas a separação de grupos de HPVs de alto e de baixo risco (HUBBARD, 2003).

A amplificação de ácidos nucleicos alvo, ou seja, a PCR, é a técnica mais sensível e pode ser usada para a detecção, quantificação de carga viral, seqüenciamento do DNA e análise de mutação. Também pode ser feita a tipagem do vírus através de PCR acompanhada de vários métodos, incluindo a técnica de *Restriction DNA Fragment of Length Polymorphic – PCR* (RFLP-PCR) ou Polimorfismos de Tamanho gerados por Fragmentos de Restrição de Produtos de PCR, hibridização reversa e seqüenciamento. Outra alternativa para a tipagem é a realização da PCR utilizando sondas específicas para determinado tipo de HPV (HUBBARD, 2003).

A infecção por HPV pode ser identificada microscopicamente no esfregaço cérvico-vaginal através da observação de efeitos citopáticos produzidos por esse vírus. Dentre esses efeitos, destaca-se a coilocitose, caracterizada pela presença de uma cavidade ao redor do núcleo e espessamento da borda citoplasmática. Outra alteração que pode estar presente durante a infecção por HPV é a disqueratose, caracterizada por ceratinização anormal da célula (GOMPEL; KOSS, 1997).

Schneider et al. (1987) propuseram a utilização de 9 sinais citológicos não clássicos para ampliar o número de casos de infecção por HPV diagnosticados através do exame citopatológico. Dentre os sinais não clássicos de infecção por HPV incluem-se: coilocitose leve, disqueratose leve, clareamento do citoplasma, grânulos de ceratohialina, condensação de filamentos, células fusiformes, hiper Cromasia nuclear, bi ou multinucleação e halo perinuclear. Os sinais citológicos não clássicos que mostraram maior correlação com a infecção por HPV foram a

coilocitose leve, disqueratose leve, hiperchromasia nuclear, bi ou multinucleação e clareamento do citoplasma. Quando estes sinais foram utilizados em conjunto, 84% dos casos de DNA-HPV positivo puderam ser identificados.

Em um estudo realizado em pacientes que apresentavam lesões cervicais pré-neoplásicas e neoplásicas diagnosticadas em esfregaços citológicos no Distrito Federal, Brasil, foi detectado DNA de HPV em 62% das amostras, através da utilização da técnica de PCR com os oligonucleotídeos MY09/MY11. O tipo mais freqüente foi o HPV 16 (49,2%) (CAMARA et al., 2003).

Em outro estudo realizado em Goiânia, no Brasil, com pacientes que apresentavam à biópsia neoplasia intra-epitelial cervical III (NIC III) e câncer cervical invasivo, foi encontrada uma prevalência total de HPV de 76 %, detectada através de PCR utilizando os oligonucleotídeos GP5+/GP6+, sendo que 79% dos casos de carcinoma de células escamosas e 61% dos casos de NIC III foram positivos para HPV. O HPV 16 foi o mais prevalente, sendo determinado através da hibridização por *dot blot* (SANTOS et al., 2003).

Em um estudo realizado em Belo Horizonte, Brasil, com 174 amostras de raspado cervical de pacientes atendidas em serviços públicos de saúde, foi observado uma ocorrência de DNA-HPV em 26,4% dos casos (incluindo os casos positivos e negativos para LEI ou neoplasia invasora do colo uterino detectadas ao exame citopatológico), através da técnica de PCR. A presença do HPV foi detectada em todos os casos de carcinoma invasor e em torno de metade das amostras com diagnóstico de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau (LBG) e lesão escamosa intra-epitelial de alto grau (LAG). De um total de 36 pacientes que apresentaram anormalidade



epitelial cervical observada à citologia, 52,7% mostraram DNA-HPV à técnica de PCR (CARMO, 2004).

Outros três estudos foram realizados em Belo Horizonte, Minas Gerais. Borges et al. (2004) utilizaram a técnica de Captura Híbrida II para a detecção de HPV em pacientes com e sem LEI do colo uterino, diagnosticadas ao exame histopatológico. Esta técnica utiliza dois grupos de sondas específicas: o grupo A, o qual detecta cinco tipos de HPV de baixo risco oncogênico e o grupo B, o qual detecta 13 tipos de HPV de intermediário/alto risco oncogênico. A taxa de detecção de HPVs de alto risco oncogênico isoladamente ou associados a HPVs de baixo risco foi 44% (11/25), 100% (10/10) e 85% (61/71) nas pacientes sem LEI do colo uterino, com neoplasia intra-epitelial cervical I (NIC I) e com neoplasia intra-epitelial cervical II/III (NICII/III), respectivamente. Souza et al. (2001), utilizando pacientes HIV positivas, que compareceram ao Centro de Treinamento e Referência de Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP) da Universidade Federal de Minas Gerais e com lesões cervicais clinicamente suspeitas de infecção por HPV, pesquisaram a presença dos HPVs 6, 11, 16 18, 31, 33 e 35 através de PCR com oligonucleotídeos específicos, em material de raspado ectocervical. Foi também colhido material de biópsia dirigida pela colposcopia, para o estudo histopatológico. A frequência da infecção por HPV detectada na biópsia foi de 53% (26/49) e pela PCR, de 85,7%(42/49). Em todos os casos de resultado histopatológico positivo para infecção por HPV, foi detectado DNA-HPV pela PCR. No entanto, 16 casos foram HPV positivos à PCR e negativos à histopatologia. Os HPVs de alto risco estavam presentes em 15 dos 16 casos de displasia cervical. Em apenas 1 caso a displasia esteve relacionada à HPV de baixo risco. Em outro estudo realizado em Belo Horizonte em que se pesquisou a prevalência do HPV e seus genótipos em

mulheres portadoras e não portadoras do vírus da imunodeficiência humana, foi observada positividade de DNA-HPV, detectado pela técnica de PCR, em 23,7% (9/38) das mulheres soronegativas, enquanto nas soropositivas essa positividade foi de 73,2% (30/41) (CAMPOS et al., 2005). Na análise das 39 pacientes com infecção por HPV (30 soropositivas e 9 soronegativas), constatou-se que o tipo 11 foi o mais freqüente nas soropositivas (13,3%), observando-se nestas pacientes a presença de todos os tipos de genótipos pesquisados (HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35). O tipo 16 foi o mais freqüente nas soronegativas, sendo que estas pacientes não apresentaram os tipos 6, 11, 18 e 35.

Cavalcanti et al. (2000) analisaram 514 amostras de colo uterino normal, e com lesões benignas, pré-malignas e malignas de pacientes do estado do Rio de Janeiro, Brasil. As pacientes foram selecionadas dentro de um grupo encaminhado para realização de exame histopatológico depois de um resultado citopatológico alterado, sendo submetidas à biópsia e à técnica de Hibridização *in situ* para a detecção do HPV. A prevalência total de DNA-HPV foi de 66,7%, variando de 85,6% nas LBG a 55,2% no carcinoma de células escamosas. Nas LBG, HPV 6/11 foram os mais prevalentes (52,6%). Nas LAG, HPV 16/18 predominaram (47,5%), assim como nos casos de carcinoma de células escamosas (60,8%). HPV 31/33/35 foram freqüentemente encontrados em LAG (15%) e carcinoma de células escamosas (16,5%). Dentre as lesões induzidas pelo HPV que regrediram espontaneamente, 64,4% apresentavam HPVs de baixo risco 6/11 e dentre as lesões que progrediram, 80,5% apresentavam HPVs de alto risco 16/18.

Lorenzato, F. et al. (2000) analisaram 479 amostras de raspado do colo uterino de pacientes de Recife, Brasil. Todas as amostras foram submetidas à análise citopatológica e à técnica de PCR, utilizando os oligonucleotídeos

MY09/MY11, para a detecção de HPV com posterior tipagem pelo método de RFLP-PCR. Dentre as amostras testadas (incluindo casos negativos e positivos para a presença de LEI e neoplasias invasoras) 44,7% apresentaram DNA-HPV. As pacientes positivas para HPV de alto risco tiveram risco 35 vezes maior de ter LAG ou câncer cervical. A tipagem de HPV apresentou 90% de sensibilidade e 85% de especificidade para a detecção de câncer cervical. Em combinação com a citologia apresentou um valor preditivo negativo de 99,4% e uma sensibilidade de mais de 96% para a detecção de LAG e câncer cervical.

Em estudo realizado no Rio de Janeiro, Brasil, com amostras citológicas apresentando resultados negativos e positivos para LEI do colo uterino, foi encontrada uma frequência de HPV de 50,1% (395/788), detectado por Captura Híbrida, variando de 25% nas amostras com resultado negativo a 100% nas amostras apresentando LAG. HPV de baixo risco oncogênico foi detectado em 11% das amostras com alterações inflamatórias. HPV de alto risco oncogênico foi encontrado em 12% das amostras com alterações inflamatórias, em 58,3% nas amostras com efeito citopático compatível com a infecção por HPV, em 63,2% das amostras com LBG e em 100% das amostras com LAG (CARVALHO et al., 2005).

Em estudo realizado na Coréia do Sul foi feita a detecção e tipagem de HPV em amostras de raspados cervicais pelo método de RFLP-PCR e sistema *microarray*, sendo observado que os HPVs de alto risco foram mais prevalentes em lesões mais graves do que em lesões benignas: cervicite (37,2%) e carcinoma (90,3%) (HWANG et al., 2003).

Kalantari et al. (1997) realizaram estudo com amostras citológicas do colo uterino através de PCR e tipagem usando sondas específicas para os tipos de HPV 6, 16, 18, 31 e 33. Foi observado que a detecção de HPV foi maior à medida que

aumentava a gravidade da lesão, sendo 85% nas amostras das pacientes do grupo de NIC III. Houve uma diminuição gradual da razão de detecção para HPV 6 e aumento para HPVs tipos 16 e 33 dos casos normais para os casos de NIC III. Nos casos de NIC I, os HPVs tipos 6 e 16 foram igualmente freqüentes, enquanto nos casos de NIC III houve predominância do tipo 16, isoladamente ou em combinação com outros tipos

Em estudo realizado com 379 pacientes que apresentavam citologia cervical alterada foi feita a detecção e tipagem de HPV pela técnica de PCR, a partir de raspados do colo uterino, utilizando os oligonucleotídeos de consenso MY09/MY11 e oligonucleotídeos específicos para HPVs 6/11, 16, 18, 31 e 33. Observou-se que a presença de HPV aumentou significativamente de 35,5% para 61,1% com o aumento da gravidade da lesão (de NIC I para NIC IV). O HPV tipo 6/11 estava fortemente associado com NIC I (33,8%), HPV tipo 31 com NIC II (22,9%) e HPV tipo 16 com NIC III (50%). A detecção de HPV 16 aumentou de NIC I para NIC III, enquanto a dos HPVs 6 e 11 diminuiu (GRCE et al., 1997).

Nindl et al. (1999) realizaram um estudo com biópsias de 114 pacientes com NIC de diferentes graus sendo avaliada a presença de HPVs de alto risco através de PCR-ensaio imunoenzimático (PCR-EIA). Neste estudo, HPVs de alto risco foram detectados em 47% das NIC I, 77% das NIC II e 97% das NIC III. Os HPVs tipos 39, 51, 56 e 58 foram encontrados exclusivamente nas NIC I (entre 2% e 8%). HPV 16 e 31 foram detectados em 12% e 2% das NIC I, 35% e 21% das NIC II e 74% e 13% das NIC III, respectivamente. Houve uma prevalência significativamente maior de HPV 16 e 31 em NIC III do que em NIC I e II.

### 2.3 EXPRESSÃO IMUNOCITOQUÍMICA DA p16<sup>INK4A</sup> EM LESÕES ESCAMOSAS INTRA-EPITELIAIS E INVASORAS DO COLO UTERINO

Durante o ciclo celular normal, quando há a passagem por um ponto na fase G1 (chamado ponto de restrição), a célula torna-se irreversivelmente comprometida a entrar na fase S e replicar seu DNA. Ciclinas do tipo D, as CDKs e a pRb regulam essa passagem através do ponto de restrição. As ciclinas se unem às CDK4 e CDK6, formando complexos ciclina-CDK ativos, cuja atividade de cinase promove a progressão pelo ponto de restrição (LODISH et al., 2004).

O produto do gene da p16<sup>INK4A</sup> é uma proteína de 15,8 kilodalton (kD), que se liga especificamente a CDK4 e CDK6, inibindo sua atividade de cinase e causando a parada do ciclo celular na fase G1. Em condições normais, a fosforilação da pRb é promovida pelos complexos ciclina-CDK, permitindo a liberação e ativação do fator de transcrição E2F do complexo pRb-E2F. O fator de transcrição E2F estimula a transcrição de genes que codificam proteínas necessárias para a síntese de DNA. A completa fosforilação da pRb irreversivelmente compromete a célula com a síntese de DNA. P16<sup>INK4A</sup>, na célula normal, atua como supressor de tumor, pois, ao inibir a fosforilação da pRb, promove a formação do complexo de transcrição repressor pRb-E2F, o qual bloqueia a progressão do ciclo celular da fase G1 para fase S (LODISH et al., 2004). A FIG. 1 mostra um desenho esquemático que representa essas etapas do ciclo celular.

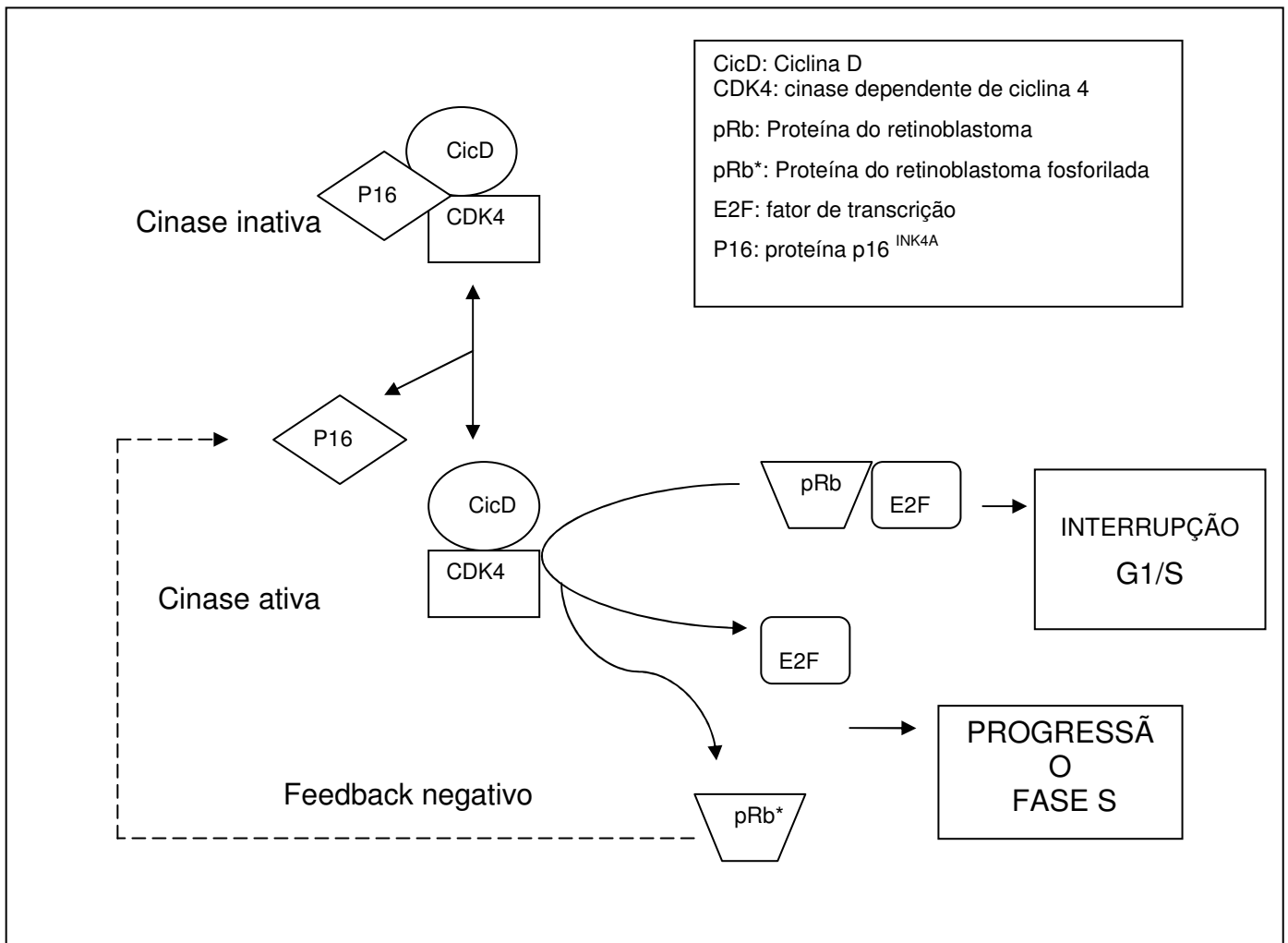


FIGURA 1: Etapas de controle do ponto de transição G1-S do ciclo celular  
 Fonte: Adaptação de LODISH et al., 2004

O gene da p16<sup>INK4A</sup> é freqüentemente inativado em uma grande variedade de tumores malignos por meio de deleção, mutação pontual ou hipermetilação do promotor. A maioria dos estudos realizados com carcinoma cervical não tem demonstrado alterações neste gene, indicando que estas alterações não são responsáveis pelo desenvolvimento deste tipo de tumor. Entretanto, foram relatados alguns resultados contrários, em que foram observadas alterações no gene da p16<sup>INK4A</sup> com alta freqüência em carcinomas cervicais (LANGOSCH; RIETHDORF, 2003; ROCCO; SIDRANSKY, 2001).

Em um estudo realizado com amostras de lesões cervicais foi observada alteração no gene da p16<sup>INK4A</sup> em 33% (15/46) dos casos, incluindo mutação, alteração alélica, deleção e metilação (TRIPATHI et al., 2003). Em outro estudo realizado com 57 amostras de carcinoma cervical não foi detectada deleção homozigótica nem mutação pontual no gene da p16<sup>INK4A</sup> (KIM et al., 1998). Em outro estudo realizado com 5 linhagens de células de câncer cervical HPV positivas, não foram detectadas alterações no gene da p16<sup>INK4A</sup> (YOSHINOUCI et al., 2000).

Na vigência de uma infecção por HPV de alto risco, a proteína E7 do HPV se liga a pRb, promovendo a liberação do fator E2F ativo, permitindo o progresso do ciclo celular da fase G1 para fase S. Ocorre uma expressão aumentada da p16<sup>INK4A</sup>, uma vez que deixa de existir o mecanismo de controle de *feedback* negativo entre a pRb e a p16<sup>INK4A</sup>. Outra explicação para a superexpressão da p16<sup>INK4A</sup> seria decorrente da indução direta do fator de transcrição E2F, o qual é liberado da pRb após a ligação da oncoproteína E7 à pRb. No entanto, a proteína p16<sup>INK4A</sup> não mostrará nenhum efeito inibitório sobre o ciclo celular, pois a pRb foi bloqueada pela oncoproteína E7 do HPV (LANGOSCH; RIETHDORF, 2003; MURPHY et al., 2005; ZIELINSKI et al., 2003). A FIG. 2 mostra um esquema representando o processo de superexpressão da p16<sup>INK4A</sup>.

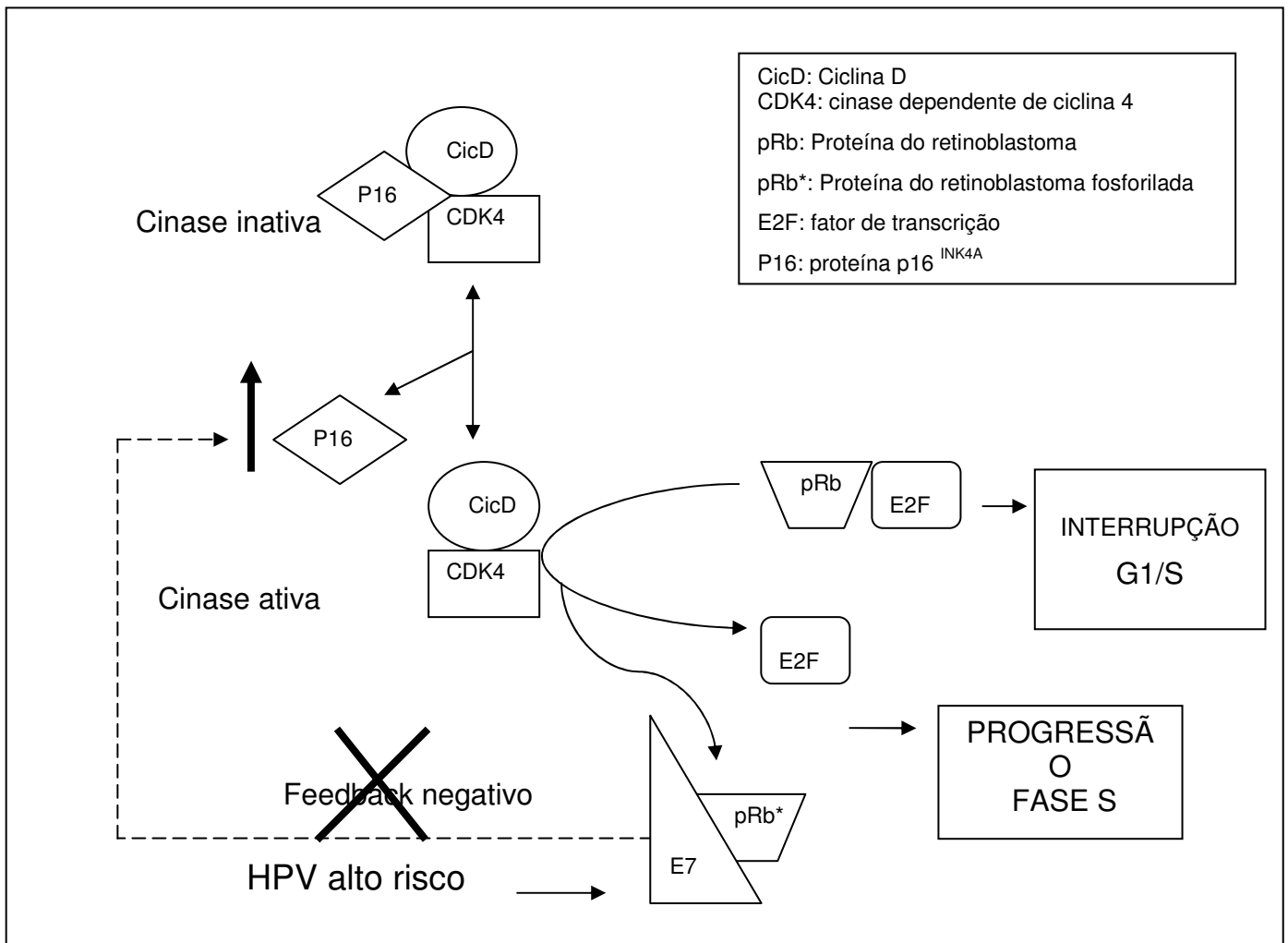


FIGURA 2: Esquema representativo da expressão aumentada de p16<sup>INK4A</sup> em células infectadas pelo HPV

Dentre alguns biomarcadores utilizados nos estudos da infecção por HPV e neoplasia cervical, destacam-se: o PCNA, o primeiro marcador de proliferação usado, Ki-67, ciclina E e telomerase, com diferentes resultados de especificidade e sensibilidade sendo relatados (KEATING et al., 2001).

A expressão da p16<sup>INK4A</sup> tem sido estudada tanto em amostras citológicas como em material de biópsia, incluindo casos com resultados negativos e positivos para LEI e neoplasias invasoras de colo uterino, além de amostras com diagnóstico de adenocarcinoma endocervical *in situ* e invasor.



Em um estudo realizado com amostras colhidas através da técnica de citologia em meio líquido, foi encontrado positividade para p16<sup>INK4A</sup> em 73,68% dos casos de LBG e em 96,1% dos casos de LAG, utilizando a técnica de imunocitoquímica. Além disso, os casos diagnosticados como LAG mostraram coloração mais forte e intensa quando comparados com lesões menos graves, indicando que a detecção imunocitoquímica de p16<sup>INK4A</sup> poderia ser utilizada como um marcador complementar da infecção por HPV e de LEI e neoplasia invasora cervical (BIBBO et al., 2002).

Saqi et al. (2002) verificaram a expressão de p16<sup>INK4A</sup> em amostras cervicais colhidas através de citologia em meio líquido, sendo observado que 9 das 10 LAG (90%) e 20 dos 27 casos de LBG (74%) apresentaram imunorreatividade para p16<sup>INK4A</sup>. Os únicos casos de carcinoma de células escamosas e de adenocarcinoma também apresentaram positividade para esta proteína, sugerindo que p16<sup>INK4A</sup> é um promissor marcador de infecção por HPV detectado em citologia em meio líquido. Entretanto, permanece a necessidade de estudos sobre a aplicação de p16<sup>INK4A</sup> em um maior número de amostras com LEI, em processos reativos e metaplásicos cervicais.

Em um estudo realizado com amostras cervicais colhidas através das técnicas de citologia em meio líquido e convencional foi detectada a presença da p16<sup>INK4A</sup> em 29 dos 30 casos de carcinoma de células escamosas (96,7%), 28 dos 30 casos de LAG (93,3%), 21 dos 40 casos de ASCUS (52,5%) e 19 dos 35 casos de LBG (54,2%). Nas amostras negativas para lesão pré-neoplásica e/ou neoplásica, a proteína não foi detectada. Todos os casos que apresentaram infecção por HPV de alto risco, detectada pela técnica de PCR seguida por hibridização *dot blot*, expressaram p16<sup>INK4A</sup>, mas nem todos os casos positivos para p16<sup>INK4A</sup> foram

HPV-DNA positivos. Isso poderia ser devido a possíveis falhas no método de detecção molecular do HPV ou mesmo no procedimento de coleta das amostras (PIENTONG et al., 2004).

Murphy et al. (2005) realizaram estudo imunocitoquímico da p16<sup>INK4A</sup> em amostras cervicais através das técnicas de biópsia e citologia em meio líquido (ThinPrep) e detectaram a presença da proteína em todas as amostras com resultado na biópsia de NIC I, NICII, NICIII e carcinoma de células escamosas, exceto em um caso de NICIII. Nas amostras de citologia em meio líquido também foi detectada a p16<sup>INK4A</sup> em todos os casos de displasia leve, moderada e acentuada, exceto em um caso de displasia moderada. Nas amostras de epitélio cervical normal não houve coloração imunocitoquímica dessa proteína. Isso sugere que a detecção imunocitoquímica de p16<sup>INK4A</sup> poderia ser utilizada como marcador complementar da displasia cervical. Entretanto, a falha na detecção de p16<sup>INK4A</sup> em uma amostra de NICII poderia limitar seu uso como teste único para identificação das lesões displásicas. Estudos adicionais são necessários para identificar precisamente o papel deste marcador em *screening* cervical primário.

Em um estudo realizado em São Paulo, Brasil, foi avaliada a expressão imunocitoquímica de p16<sup>INK4A</sup> em 156 amostras de citologia em meio líquido com diagnóstico negativo para LEI e/ou neoplasias invasoras do colo uterino e 43 com diagnóstico de ASCUS. Dentre as amostras com resultado negativo, 64,7% (101/156) apresentaram infecção por HPV. Dentre estas 101 amostras HPV positivas e diagnóstico citopatológico negativo, 68,3% (69/101) foram p16<sup>INK4A</sup> positivas. Dentre as HPV negativas, 11% (6/55) foram p16<sup>INK4A</sup> positivas. Considerando as amostras com diagnóstico de ASCUS, 37,2% (16/43) foram HPV positivas. Dentre as HPV positivas, 75% (12/16) foram p16<sup>INK4A</sup> positivas e dentre as

HPV negativas, 48,1% (13/27) foram positivas para p16<sup>INK4A</sup>. Após 12 meses de seguimento das pacientes com diagnóstico de ASCUS, 6 mantiveram o diagnóstico de ASCUS, das quais 4 foram HPV e p16<sup>INK4A</sup> positivas. Duas dentre as 43 apresentaram diagnóstico de LAG e uma, de LBG, sendo todas elas HPV e p16<sup>INK4A</sup> positivas. A detecção imunocitoquímica de p16<sup>INK4A</sup> poderia ser útil na identificação de pacientes com diagnóstico citológico de ASCUS que apresentam uma maior probabilidade de progressão da lesão. Sendo assim, a utilização de p16<sup>INK4A</sup> tem sido sugerida para compensar a falta de especificidade do teste de HPV, já que um teste de HPV de alto risco positivo não significa que a paciente desenvolverá lesão cervical (LONGATTO FILHO et al., 2005).

Nieh et al. (2005) compararam a expressão imunocitoquímica de p16<sup>INK4A</sup> com o teste de Captura Híbrida II, que detecta HPV de alto risco oncogênico, em 66 amostras citológicas com diagnóstico de ASCUS, observando a evolução desses casos em biópsias subseqüentes. Nesse estudo, a imunocoloração de p16<sup>INK4A</sup> apresentou 95% de sensibilidade, 96% de especificidade, valor preditivo positivo de 91% e valor preditivo negativo de 98% para identificar casos que se mostraram positivos no seguimento realizado através de biópsia. Por outro lado, a determinação de HPV de alto risco apresentou 86% de sensibilidade, 31% de especificidade, valor preditivo positivo de 37% e valor preditivo negativo de 82%, havendo diferença estatisticamente significativa na especificidade e valor preditivo positivo entre a imunocoloração de p16<sup>INK4A</sup> e a detecção de HPV de alto risco. Neste estudo, os autores verificaram ainda que, 6 amostras (9,1%) que apresentaram imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup>, não apresentaram infecção por HPV de alto risco, sugerindo que mecanismos independentes de HPV poderiam conduzir à expressão aumentada de p16<sup>INK4A</sup>. Não se pode excluir também a possibilidade da

sensibilidade técnica na identificação de HPV ter sido um fator limitante. Assim, a correlação entre HPV de alto risco e expressão de p16<sup>INK4A</sup> em esfregaços com diagnóstico de ASCUS e com biópsias subseqüentes apresentam certas consistências e também discordâncias.

Em um estudo realizado com 186 pacientes apresentando resultados citológicos negativos e positivos para LEI e/ou neoplasias invasoras do colo uterino, foi realizada a análise imunocitoquímica em esfregaços de amostras cervicais para detecção de p16<sup>INK4A</sup> e Captura híbrida II para detecção de HPV. As amostras de todas as pacientes apresentando LAG e carcinoma de células escamosas apresentaram imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup> e DNA-HPV detectado por Captura Híbrida II. Nas amostras apresentando LBG, 64% apresentaram imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup> e 27% apresentaram infecção por HPV. Nas amostras com ASCUS, 62% foram p16<sup>INK4A</sup> positivas e não foi detectado DNA-HPV em nenhuma delas. Dentre as amostras com resultado negativo para LEI e/ou neoplasias invasoras do colo uterino, 7,4% apresentaram imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup> e 3,4% apresentaram DNA-HPV. Houve 18 amostras que apresentaram imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup> e foram HPV-negativas. Todas as amostras positivas para HPV de alto risco, foram p16<sup>INK4A</sup> positivas (22 casos). Os autores sugerem que o uso combinado de p16<sup>INK4A</sup> e teste de HPV poderia ser útil na identificação de células com anormalidades menores e que possuem um risco maior de progressão para neoplasia cervical (EKALAKSANANAN et al., 2006).

Em outro estudo realizado com 139 amostras de biópsias cervicais, incluindo casos de condiloma acuminado, LBG, LAG e carcinoma invasivo, foram utilizadas as técnicas de imuno-histoquímica para detecção de p16<sup>INK4A</sup>, Hibridização *in situ* e

PCR para a detecção de HPV. Foi observada imunorreatividade difusa e forte da p16<sup>INK4A</sup> em todos os casos de câncer cervical e em lesões pré-neoplásicas com infecção por HPVs de alto e intermediário risco. LBG com infecção por HPV de baixo risco apresentaram imunorreatividade fraca e focal. Isto indica que a superexpressão de p16<sup>INK4A</sup> ocorre na maioria das lesões pré-neoplásicas cervicais e que o padrão de sua imunorreatividade poderia colaborar na diferenciação entre a infecção por HPV de baixo, intermediário e alto risco (SANO et al., 1998).

Agoff et al. (2003) realizaram estudo imuno-histoquímico para a detecção da p16<sup>INK4A</sup> em biópsias do colo uterino e detecção de HPV em amostras de swab cervical através das técnicas de Captura Híbrida e PCR. Foi observado que o grau de expressão de p16<sup>INK4A</sup> correlacionou com o grau da neoplasia cervical. Apenas 12% dos casos de lesões reativas mostraram imunorreatividade para a p16<sup>INK4A</sup>; 57% dos casos de NIC I apresentaram imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup>, comparado com 75% dos casos de NIC II, 91% dos casos de NIC III e 89% dos casos de carcinoma invasor. A maioria das lesões de NIC positivas para p16<sup>INK4A</sup> foram também positivas para HPV de alto risco pela técnica de Captura Híbrida (84%). 90% dos casos de NIC III foram positivos para p16<sup>INK4A</sup> e HPV de alto risco detectado pela técnica de PCR. Os autores sugerem que a p16<sup>INK4A</sup> poderia ser utilizada como marcador de neoplasia escamosa cervical.

Por outro lado, imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup> foi detectada em amostras cervicais com metaplasia tubo-endometrióide e em biópsias de endométrio não neoplásico. Isto poderia ter importantes implicações na utilização potencial da p16<sup>INK4A</sup> como biomarcador de lesões glandulares displásicas e neoplásicas, gerando falhas na prática clínica (MURPHY et al., 2004).

Em estudo realizado com biópsias apresentando diagnóstico de NIC I que foram acompanhadas, foi pesquisada a expressão de p16<sup>INK4A</sup> como marcador de risco de progressão de lesões displásicas de baixo grau. A expressão imunohistoquímica de p16<sup>INK4A</sup> foi avaliada em 32 amostras com NIC I que apresentaram regressão espontânea no seguimento (grupo A), 31 (grupo B) que apresentaram progressão para NIC III e 33 (grupo C) escolhidas aleatoriamente como grupo controle (NIC I). Nesse estudo foi observado imunorreatividade positiva difusa em 43,8%, 74,2% e 56,3% nos grupos A, B e C, respectivamente. Dentre os casos que apresentaram regressão no seguimento, apenas 37,8% apresentaram imunorreatividade positiva difusa, enquanto que dentre os casos que progrediram para NIC III, essa positividade foi de 62,2%. Sendo assim, apesar de ser observada imunorreatividade positiva dentre as lesões que regrediram espontaneamente, os casos de NIC I com coloração difusa apresentaram maior tendência à progressão para lesão de alto grau quando comparados com os casos p16<sup>INK4A</sup> negativos (NEGRI et al., 2004).

Em um estudo realizado com 197 biópsias incluindo amostras negativas e positivas para LEI e neoplasias invasoras do colo uterino, foi observado que a expressão da p16<sup>INK4A</sup> aumentou à medida que aumentava a gravidade da lesão (NIC I- NIC II- NIC III- carcinoma invasor). Também se observou que um terço dos casos de NIC III e um caso de carcinoma invasivo foram p16<sup>INK4A</sup> negativos, sendo que todas as amostras apresentando NIC e carcinomas invasivo apresentaram HPV de alto risco oncogênico. Esses resultados sugerem que a falta de expressão de p16<sup>INK4A</sup> em amostras contendo diferentes tipos de lesão cervical não é uma razão suficiente para excluir a paciente do grupo de alto risco (VOLGAREVA et al., 2004).

Em um estudo realizado com amostras de biópsias com diagnóstico de LBG, LAG e negativo para LEI e/ou neoplasia invasora do colo uterino, foi detectado HPV de alto risco oncogênico em 100% (43/43) das amostras com diagnóstico de LAG, em 93,1% (27/29) das com LBG e em 55,6% (15/27) das com diagnóstico negativo. Dentre as amostras negativas na biópsia, 3,7% (1/27) apresentaram imunorreatividade fraca para p16<sup>INK4A</sup>. Dentre as amostras com diagnóstico de LBG, 17,2% (5/29) e 51,7% (15/29) apresentaram imunorreatividade fraca e forte, respectivamente. Dentre as LAG, 11,6% (5/43) e 81,4% (35/43), apresentaram imunorreatividade fraca e forte, respectivamente. Foi observado que 14 das 29 amostras de LBG e 8 das 43 de LAG apresentaram imunorreatividade negativa ou baixa, apesar da presença de HPV de alto risco. Isto poderia ser explicado por um tempo prolongado de fixação das amostras na formalina, por expressão diferente da oncoproteína E7 pelo vírus e/ou por eventual regressão da lesão (LORENZATO, M. et al., 2005).

Em um estudo realizado em São Paulo, Brasil, foi avaliada a expressão imunohistoquímica de p16<sup>INK4A</sup> em 65 biópsias apresentando LBG, as quais foram acompanhadas por 6 meses a 1 ano e submetidas à segunda biópsia, sendo que 27 mantiveram o diagnóstico de LBG e 38 progrediram para LAG. Nas amostras da segunda biópsia com diagnóstico de LBG, foi observado imunorreatividade negativa para p16<sup>INK4A</sup> em 61,5%, enquanto que na segunda biópsia com diagnóstico de LAG foi observada imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup> em 66,7% das amostras. No grupo que progrediu de LBG para LAG na segunda biópsia foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a expressão aumentada da p16<sup>INK4A</sup> e a presença de HPV 16, detectado por PCR. Esses resultados sugerem que a detecção imuno-histoquímica de p16<sup>INK4A</sup> poderia ser utilizada como um biomarcador

da progressão para o câncer cervical relacionado com a infecção por HPV (GUIMARÃES et al., 2005).

Em um estudo realizado com 117 biópsias, sendo 47 carcinomas de células escamosas invasivo, 10 NIC I, 4 NIC II, 16 NIC III, 20 adenocarcinomas e 20 biópsias negativas para LEI e/ou neoplasias invasoras do colo uterino, foi detectada expressão de p16<sup>INK4A</sup> por imuno-histoquímica em 100% dos casos de adenocarcinoma (20/20), em 78,7% dos carcinomas de células escamosas (37/47), em 96,7% das NIC (29/30) e em nenhuma das amostras com diagnóstico negativo. O HPV foi detectado pela técnica de *microarray* em 50% das NIC, 61,7% dos carcinomas de células escamosas e em 45,5% dos adenocarcinomas. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de p16<sup>INK4A</sup> entre lesões HPV positivas e HPV negativas. Nesse estudo, foi encontrado imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup> em grande parte de NIC e carcinomas invasivos HPV negativos, o que poderia sugerir mecanismos independentes de HPV responsáveis pelo aumento na expressão da p16<sup>INK4A</sup> (LIN et al., 2005).

Em um estudo realizado no Rio Grande do Sul, Brasil, detectou-se HPV em 48 das 54 biópsias que apresentavam diagnóstico de LEI e neoplasias invasoras do colo uterino. Dentre as amostras HPV positivas, foi observada expressão de p16<sup>INK4A</sup> em 1/3 das amostras com diagnóstico de LBG, em 18/19 daquelas com resultado de LAG e em 26/26 das amostras com diagnóstico de carcinoma cervical. Houve expressão de p16<sup>INK4A</sup> em 5 amostras em que não foi detectado HPV (2 LBG, 2 LAG e 1 Carcinoma) (LAMBERT et al., 2006).

Em um estudo realizado com amostras de biópsia foi detectado HPV de alto risco oncogênico por PCR em 69,8% (37/53), 97,5% (39/40), 91,7% (44/48) e 100% (16/16) dos casos de NIC I, NIC II, NIC III e carcinoma de células escamosas,



respectivamente. Nos casos positivos para HPV de alto risco, 32,4% (12/37) das amostras com diagnóstico de NIC I, 82,1% (32/39) de NIC II, 93,2% (41/44) de NIC III e 100% (16/16) de carcinoma de células escamosas mostraram expressão aumentada de p16<sup>INK4A</sup>. O percentual de expressão de p16<sup>INK4A</sup> foi proporcionalmente maior à medida que o grau da lesão aumentava, havendo diferença estatisticamente significativa entre a expressão de p16<sup>INK4A</sup> em NIC I e em lesões de maior grau (ISHIKAWA et al., 2006).

Em relação à imunorreatividade da p16<sup>INK4A</sup> e o epitélio endocervical, verifica-se que as glândulas endocervicais normais são p16<sup>INK4A</sup> negativas, com casos ocasionais exibindo positividade fraca e focal (O'NEILL; CLUGGAGE, 2006). Em contraste, a maioria das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas endocervicais exibem positividade para p16<sup>INK4A</sup>. Estudos têm mostrado maior expressão da p16<sup>INK4A</sup> em pacientes portadoras de adenocarcinoma cervical *in situ* e invasor, quando comparado com os controles. Em um estudo de pacientes com biópsias apresentando adenocarcinoma *in situ* e invasor do colo uterino, foi feita a detecção e tipagem de HPV pela técnica de PCR, além de reação imuno-histoquímica para detecção de p16<sup>INK4A</sup>. Todas as biópsias de adenocarcinoma *in situ* e 94% dos casos de adenocarcinoma invasor apresentaram HPV de alto risco. A imunorreatividade para p16<sup>INK4A</sup> foi mais freqüente nos casos positivos para HPV do que nos negativos. Nenhum dos casos de adenocarcinoma endometrial foi positivo para HPV e nenhum mostrou coloração difusa de p16<sup>INK4A</sup> (SCHORGE et al., 2004; ZIELINSKI et al., 2003). Entretanto, um pequeno número de adenocarcinomas cervicais são p16<sup>INK4A</sup> negativos porque não estão associados com HPV de alto risco, uma vez que a relação entre estes tipos de HPV e adenocarcinoma cervical não é tão forte quanto para o carcinoma escamoso (O'NEILL; CLUGGAGE, 2006).

Pode-se constatar, portanto, através do relato destes estudos, que a expressão da proteína p16<sup>INK4A</sup> tem sido pesquisada em lesões cervicais escamosas e glandulares, e que talvez, a detecção imunocitoquímica desta proteína poderia ser utilizada como marcador complementar da infecção por HPV de alto risco.

Considerando a importância do câncer de colo de útero como problema de saúde pública, e que apenas uma pequena parcela das pacientes que mostram infecção por HPV apresentam risco de desenvolver esta neoplasia, é nossa proposta detectar a presença de HPV e de alguns subtipos virais em amostras cervicais em meio líquido, e correlacionar estes resultados com a expressão imunocitoquímica da proteína p16<sup>INK4A</sup>.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de HPV e a pesquisa dos subtipos virais 16 e 18 em pacientes com e sem LEI e neoplasia invasora do colo uterino e correlacionar estes resultados com a expressão imunocitoquímica da proteína p16<sup>INK4A</sup> em esfregaços cervicais.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Padronizar a técnica de PCR para a detecção do HPV e dos subtipos virais 16 e 18;
- Determinar a frequência da infecção por HPV e dos subtipos virais 16 e 18 na população estudada;
- Analisar os esfregaços corados pelo método de Papanicolaou quanto à presença de LEI e neoplasias invasoras do colo uterino;
- Correlacionar a presença ou ausência de LEI ou neoplasias invasoras com a detecção molecular dos HPVs 16 e 18;
- Padronizar a técnica de imunocitoquímica para detecção da proteína p16<sup>INK4A</sup> em amostras cervicais coletadas em meio líquido;

- Determinar a expressão imunocitoquímica da proteína p16<sup>INK4A</sup> nas amostras cervicais;
- Correlacionar a expressão da proteína p16<sup>INK4A</sup> com os subtipos de HPV detectados nas pacientes com e sem LEI e neoplasias invasoras do colo uterino.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

Participaram deste estudo pacientes que apresentaram resultado histopatológico positivo ou negativo para LEI ou neoplasia invasora do colo uterino e que retornaram ao serviço de Propedêutica do Colo Uterino da Maternidade Odete Valadares de Belo Horizonte ou ao Posto de Atendimento Médico da Sagrada Família. Ambos os serviços são semelhantes quanto à população atendida, uma vez que as pacientes são encaminhadas de centros de saúde de atenção primária, por apresentarem suspeita de anormalidade epitelial cervical ao exame macroscópico (teste de Schiller positivo) do colo uterino ou sua constatação através de exame citopatológico ou histopatológico.

As pacientes foram divididas em dois grupos:

- Grupo “biópsia positiva”: 72 pacientes com resultado histopatológico positivo para infecção por HPV e/ou LEI ou neoplasia invasora do colo uterino.
- Grupo “biópsia negativa”: 57 pacientes com resultado histopatológico negativo para infecção por HPV e/ou LEI ou neoplasia invasora do colo uterino.

Foram excluídas as pacientes submetidas a qualquer tipo de tratamento prévio para infecção por HPV e LEI ou neoplasia invasora de colo uterino. Apenas os resultados histopatológicos obtidos no período de até um ano anterior à data de coleta da amostra citopatológica foram considerados. Estas medidas garantiriam

maior número de amostras positivas a serem estudadas, tendo em vista a maioria das infecções por HPV são transitórias e tendem a regredir dentro de 1 ano.

Todas as análises histopatológicas foram realizadas nos serviços acima especificados e os resultados foram gentilmente disponibilizados para este estudo.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, parecer nº. 381/05 (Anexo 1), sendo que as pacientes participantes do estudo leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1).

#### 4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Com a utilização de uma escova, foi coletado material da endocérvice, junção escamo-colunar e ectocérvice. A escova contendo o material foi colocada em um tubo contendo 1 mililitro (mL) de uma solução que preserva as células (Universal Collection Medium – DIGENE), possibilitando tanto o estudo molecular como a preparação dos esfregaços para estudo citopatológico e imunocitoquímico. A coleta do material foi realizada pelos médicos ginecologistas dos Serviços acima referidos.

Para a confecção dos esfregaços das amostras cervicais que foram submetidos à coloração de Papanicolaou e à análise imunocitoquímica foi utilizada a técnica de citologia em meio líquido, sistema DNA Citoliq<sup>®</sup> (DIGENE), conforme descrito a seguir: o líquido presente no tubo foi homogeneizado durante 15 segundos. A seguir, 200 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) foram colocados sobre uma membrana de

polycarbonato, para a realização de um *imprint*, transferindo-se para a lâmina todo o material não filtrado.

As amostras foram armazenadas, de acordo com as instruções do fabricante, no meio de conservação das células, permanecendo por, no máximo, 2 semanas à temperatura ambiente e, posteriormente, sendo armazenadas em geladeira por até 6 meses.

### 4.3 ANÁLISE CITOPATOLÓGICA

Após a confecção, os esfregaços foram fixados em álcool etílico a 95%, com posterior coloração pelo método de Papanicolaou. Os esfregaços foram analisados aleatoriamente, sem o conhecimento do resultado dos testes moleculares. Os resultados observados foram classificados segundo o Sistema de Bethesda (SOLOMON et al., 2002) e relatados em laudos de acordo com a Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais e Condutas Preconizadas (NOMENCLATURA ..., 2006). Entretanto, neste estudo, foram avaliados apenas os aspectos relacionados à presença de atipias celulares.

#### 4.4 ANÁLISE MOLECULAR

A análise molecular foi realizada a partir de uma alíquota retirada da amostra coletada em meio líquido. Foram executadas as seguintes etapas:

- Extração do DNA das amostras
- Realização de PCR para amplificação de fragmento do gene da  $\beta$ globina humana
- Realização de PCR para detecção genérica de HPV utilizando os oligonucleotídeos GP5+/GP6+.
- Pesquisa dos HPVs 16 e 18 em todas as amostras, através da técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para estes vírus.
- Eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração pela prata dos produtos de PCR

A extração do DNA foi realizada homogeneizando-se as células contidas nos tubos e transferindo-se 200  $\mu$ L para tubos *ependorf*. Esse material foi centrifugado a 3000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante era descartado e as células eram re-suspendidas em 400  $\mu$ L de solução de lise de hemáceas com posterior centrifugação dos tubos a 10000 rpm durante 5 minutos para remover a hemoglobina. Se o sedimento apresentasse traços vermelhos de hemoglobina, desprezava-se o sobrenadante com a pipeta e repetia-se a lavagem com 400  $\mu$ L de solução de lise de hemáceas e desprezava-se o sobrenadante com pipeta. O sedimento era re-suspendido em 300  $\mu$ L de tampão de lise. O tampão de lise era constituído de 15  $\mu$ L de duodecil sulfato de sódio (SDS) 10%; 0,3  $\mu$ L de proteinase K 50 ng/ml; quantidade suficiente para (qsp) 300  $\mu$ L de telow. Essa suspensão era colocada em banho maria a 56°C durante 1 hora com posterior



inativação em banho maria a 95°C durante 10 minutos. Em seguida, adicionava-se 70 µL de acetato de amônio 7,5 mM e 370 µL de isopropanol gelado 1:1. Invertia-se o tubo várias vezes e centrifugava-se a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante era desprezado e era adicionado 1 mL de etanol gelado 95% sobre o *pellet*, invertendo-se várias vezes. Em seguida, esse material era centrifugado a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C, secava-se o *pellet* por inversão do tubo *ependorf* em papel absorvente e fazia-se a re-suspensão do *pellet* em 100 µL de telow, levando à refrigeração.

Todas as amostras foram submetidas à pesquisa da infecção por HPV por meio da reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos de consenso GP5+/GP6+. Para cada reação, foram utilizados 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP), 1 UI de Taq polimerase, tampão (1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 50 mM de NaCl; 10 mM de Tris pH 8,4; 0,1% de Triton), 0,5 pmol/µL de cada oligonucleotídeo, 1,0 µL de solução de DNA extraído, água Mili-Q autoclavada qsp 10 µL e uma gota de óleo mineral para evitar evaporação.

A seqüência de bases do oligonucleotídeo GP5+ é 5' TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC3' e a do GP6+ é 5' GAAAATAAACTGTAAATCATATTC3'. Este par de oligonucleotídeos amplifica uma seqüência de aproximadamente 150 pares de bases (pb) da região L1 do genoma do HPV (HUSMAN et al., 1995).

Todas as amostras também foram submetidas a reações de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para os HPV 16 e 18, os quais amplificam um fragmento de DNA de 152 e 216 pb, respectivamente. A seqüência de bases para os oligonucleotídeos específicos para HPV16 são 5'TGCTAGTGCTTATGCAGCAA3' e 5'ATTTACTGCAACATTGGTAC3' e para o HPV 18 são

5'AAGGATGCTGCACCGGCTGA3' e 5'CACGCACACGCTTGGCAGGT3' (GRCE et al., 1997). As quantidades e concentrações dos reagentes foram iguais à reação de PCR com os oligonucleotídeos de consenso.

Todas as amostras também foram submetidas a uma reação de PCR que amplifica o gene da  $\beta$ globina humana, utilizando os oligonucleotídeos PC03/PC04. As quantidades e concentrações dos reagentes foram iguais às da reação de PCR para HPV. Os oligonucleotídeos PC03 e PC04 amplificam uma seqüência de aproximadamente 100 pares de bases do gene da  $\beta$  globina humana, e funcionam como controle interno da reação para verificar a integridade de DNA extraído. A seqüência de bases do oligonucleotídeo PC03 é 5'ACACAACCTGTGTTCACTAGC3' e a do PC04 é 5'CAACTTCATCCACGTTCAACC3' (SAIKI et al., 1988).

As reações de PCR foram realizadas em termocicladores modelo PTC-100<sup>TM</sup> Programmable Thermal Controller da marca MJ Research e PX2 Thermo Electron Corporation. Foram realizados 40 ciclos de reação sob as condições apresentadas na TAB. 1, para cada par de oligonucleotídeos utilizados, exceto para PC03/PC04, para os quais foram realizados 35 ciclos.

TABELA 1 – Condições de temperatura das reações de PCR

Oligonucleotídeos	Etapas da reação de PCR		
	Desnaturação	Anelamento	Extensão
PC03/PC04	94 °C - 1 minuto	55 °C - 1 minuto	72 °C -1 minuto
GP5+/GP6+	95 °C- 1 minuto	45 °C- 1 minuto	72 °C-1 minuto
HPV 16	94 °C- 30 segundos	57 °C- 30 segundos	72 °C-1 minuto
HPV 18	94 °C- 30 segundos	65 °C- 30 segundos	72 °C-1 minuto

Os produtos da PCR, juntamente com o padrão de peso molecular, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e corados pela prata.

A técnica de PCR para detecção de DNA-HPV foi padronizada no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia, durante a realização da dissertação de mestrado da aluna Bianca Bianco do Carmo, defendida em 2004, junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Minas Gerais. Neste trabalho, foi pesquisada a frequência da infecção por HPV em pacientes atendidas em dois serviços públicos de Belo Horizonte, através da técnica de PCR, utilizando os oligonucleotídeos MY09/MY11, descritos previamente por Manos et al. (1989).

No intuito de aperfeiçoar a técnica de PCR previamente padronizada por Carmo (2004), foram selecionadas amostras previamente coletadas e armazenadas que apresentavam LEI ou neoplasia invasora ao exame citológico, nas quais não foi detectado a presença de DNA-HPV pela técnica de PCR quando submetidas ao protocolo de extração de acordo com Villa et al. (1995) e PCR empregando-se os

oligonucleotídeos MY09/MY11. Estas amostras foram submetidas a um novo protocolo de extração e, posteriormente, a reações de PCR utilizando tanto os oligonucleotídeos MY09/MY11, quanto os GP5+/GP6+.

A PCR específica foi testada em amostras sabidamente positivas para os HPVs 16 e 18 que foram gentilmente cedidas pelo Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

As etapas de extração do DNA, preparo da solução com os reagentes para a reação de PCR, adição do DNA à solução de reagentes e eletroforese dos produtos de PCR foram realizadas em salas diferentes para evitar contaminação.

Em todas as reações de PCR foram incluídos controle positivo (amostra sabidamente positiva) e branco da reação, o qual contém todos os reagentes, exceto o DNA. Assim, foi realizado o controle de qualidade dos reagentes e do processo da reação de PCR.

#### 4.5 ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA

Empregou-se a técnica de imunocitoquímica para a detecção da proteína p16<sup>INK4A</sup> utilizando-se o Kit Citológico do CINtec<sup>TM</sup> p16<sup>INK4A</sup> (DAKO, n. K5339 - DAKOCYTOMATION, 2004). Após confecção e fixação do esfregaço em etanol por aproximadamente 24 horas, foi feita a reativação antigênica da p16<sup>INK4A</sup>, através de aquecimento em banho maria entre 95-99°C durante 1 hora, utilizando-se solução de reativação antigênica, fornecida juntamente com o Kit. Posteriormente, as

seguintes etapas foram seguidas: bloqueio da peroxidase endógena (5 minutos), incubação com anticorpo primário p16<sup>INK4A</sup> clone E6H4 (30 minutos), incubação com reagente de visualização (30 minutos), revelação com solução cromógena de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (10 minutos) e contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Essas etapas foram realizadas em temperatura ambiente.

Considerou-se como reação imunocitoquímica positiva os esfregaços que apresentaram coloração nuclear e/ou citoplasmática em mais de 10 células (EKALAKSANANAN et al., 2006; PIENTONG et al., 2004; SAQI et al., 2002).

O processamento das amostras cervicais e as análises citopatológica, imunocitoquímica e molecular foram realizadas pela mestranda, após a realização de um treinamento. Os resultados obtidos após as análises citopatológicas e imunocitoquímicas foram revistos pela orientadora do trabalho. O resultado do estudo molecular foi revisto pela co-orientadora.

As amostras foram analisadas de forma aleatória sem o conhecimento dos resultados moleculares e citopatológicos.

#### 4.6 CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES REALIZADAS

As amostras de todas as pacientes (129) foram submetidas à análise citopatológica e aos testes moleculares para detecção e tipagem de HPV. O teste imunocitoquímico para detecção da expressão da proteína p16<sup>INK4A</sup> foi realizado em 97 amostras. Para a correlação entre a presença ou ausência de LEI ou neoplasia

invasora do colo uterino e a expressão da proteína p16<sup>INK4A</sup> e os subtipos de HPV's detectados foram considerados os resultados obtidos na análise citopatológica.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação de diferenças entre proporções, no caso de tabelas balanceadas, foi realizado o teste Qui-quadrado de Pearson, e, no caso de desbalanceamento (pelo menos uma célula da tabela com frequência esperada menor que 5) foi utilizado o Teste Exato de Fischer. Para a quantificação das diferenças encontradas foram calculadas as razões de chance (*Odds Ratio* – OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Para todos os testes foi considerado o nível de significância  $\alpha = 0,05$ . O programa utilizado consiste no pacote estatístico SPSS 9.0.

Para a normalização do conteúdo da presente dissertação foram seguidas as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), NBR 14724, 6023 e 10520 (ASSOCIAÇÃO, 2002abc).

O cálculo amostral foi realizado segundo Daniel (1983), obtendo-se um resultado de n=263 amostras. Considerando as dificuldades técnicas de obtenção deste número de amostras, bem como o prazo pré-definido para o término dessa dissertação, utilizamos no presente trabalho, 129 amostras. Cabe ressaltar, no entanto, que nos trabalhos da literatura analisados, verificamos a utilização de um número de amostras que variou de 54 a 569. Dentre 19 trabalhos analisados, 12 foram realizados com material de biópsia, 5 com citologia e 2 com biópsia e

citologia. Dentre os trabalhos que utilizaram biópsia, a variação no número de amostras foi de 54 a 569 e dentre os trabalhos realizados com citologia a variação foi de 66 a 199 amostras.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PADRONIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR GERAL PARA DETECÇÃO DO HPV

Todas as amostras avaliadas neste trabalho, antes de serem submetidas à reação de PCR para HPV, foram submetidas à reação de PCR para  $\beta$ -globina humana, sendo observada em todas elas a amplificação do fragmento de DNA de aproximadamente 100 pb referentes a este gene, conforme ilustrado na FIG.3.

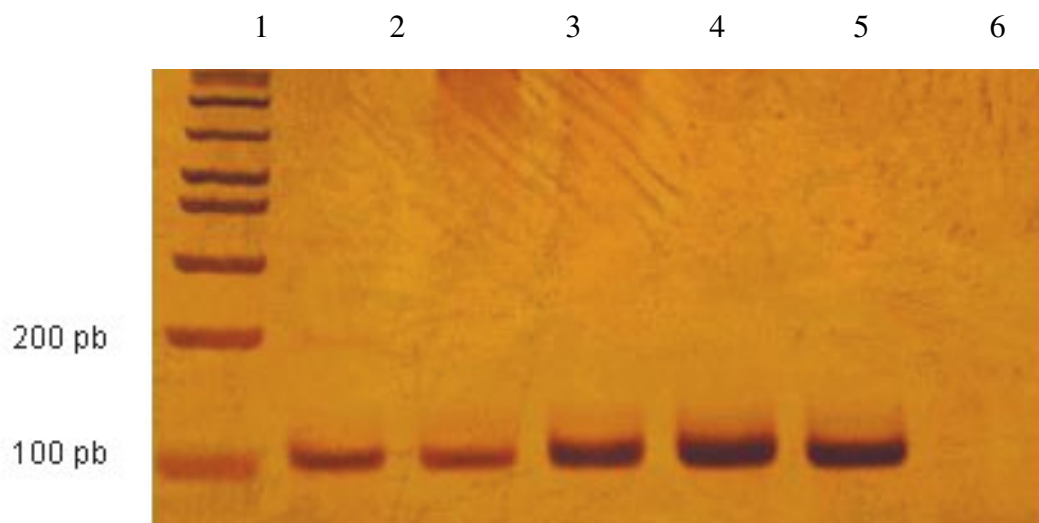


FIGURA 3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado pelo nitrato de prata, apresentando o produto de PCR do gene da  $\beta$ -globina humana.

Canaleta 1 – Padrão de peso molecular (1 kb plus DNA LADDER – GIBCO BRL® - São Paulo, SP)

Canaletas 2 a 6- Fragmento de aproximadamente 100 pb, correspondente à banda do fragmento amplificado do gene da  $\beta$ -globina humana

Canaleta 7- Controle negativo da reação



Durante a etapa de padronização e otimização da técnica de PCR, observou-se que o novo protocolo de extração empregado proporcionou detecção de DNA-HPV em um maior número de amostras, quando comparado com o protocolo de extração utilizado anteriormente (TAB. 2). Assim, optou-se pelo novo protocolo de extração de DNA, descrito na seção Material e Métodos, para a realização do presente trabalho.

A reação de PCR para a pesquisa de HPV foi padronizada utilizando os oligonucleotídeos de consenso GP5+/GP6+, empregando-se como temperatura de anelamento inicial uma média das temperaturas descritas em trabalhos publicados na literatura (CARRILLO et al., 2004; KARLSEN et al., 1996; ZEHBE; WILANDER, 1996). Utilizou-se como controle positivo amostras de DNA de célula Hella, infectada com HPV 18 (MURPHY et al., 2005), e amostras sabidamente positivas obtidas do trabalho de dissertação de mestrado da aluna Bianca Bianco do Carmo. A FIG. 4 ilustra a amplificação do fragmento de aproximadamente 150 pb do genoma do HPV.

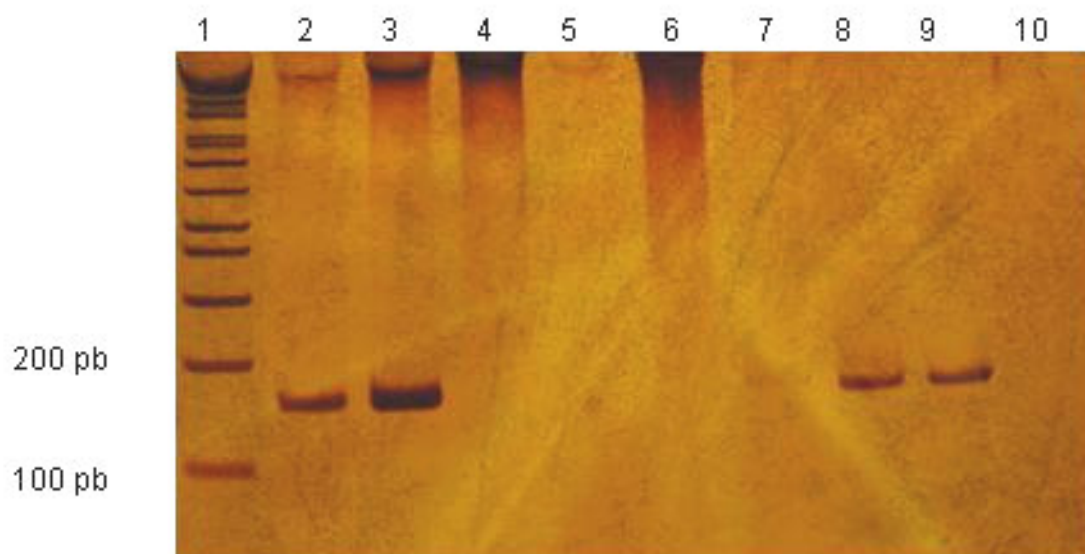


FIGURA 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado pelo nitrato de prata, apresentando o produto de PCR- HPV.

Canaleta 1 – Padrão de peso molecular (1 kb plus DNA LADDER – GIBCO BRL® - São Paulo, SP)

Canaleta 2 - Fragmento de aproximadamente 150 pb, correspondente à banda do fragmento amplificado de DNA de HPV (controle positivo)

Canaletas 3,8 e 9 – Amostras positivas para DNA-HPV

Canaletas 4, 5, 6 e 7 – Amostras negativas para DNA-HPV

Canaleta 10 - Controle negativo da reação

Foi observado um maior número de amostras em que foi detectado DNA-HPV pela técnica de PCR utilizando os oligonucleotídeos GP5+/GP6+ e um menor número de bandas inespecíficas, quando comparados com MY09/MY11, optando-se pela utilização do primeiro par de oligonucleotídeos para a realização deste trabalho. A TAB. 2 mostra esses resultados.

TABELA 2 – Comparação entre dois protocolos de extração de DNA e entre os oligonucleotídeos MY09/MY11 e GP5+/GP6+ para a detecção de DNA-HPV.

AMOSTRAS Citologia Positiva	MY 09/MY11 Protocolo extração anterior	MY 09/MY11 Novo protocolo extração	GP5+/GP6+ Novo protocolo extração
1	-	-	-
2	-	+	+
3	-	+	-
4	-	+	+
5	-	+	+
6	-	+	+
7	-	-	+
8	-	-	+
9	-	+	+
10	-	-	+
11	-	-	+
12	-	-	+
13	-	+	+
14	-	-	-
15	-	-	+
16	-	+	-

## 5.2 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR ESPECÍFICA PARA OS HPVS 16 E 18

A reação de PCR para a pesquisa dos HPVs 16 e 18 foi padronizada utilizando-se amostras sabidamente positivas para estes tipos de HPV, anteriormente testadas e gentilmente cedidas pelo NUPAD da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Para a padronização da reação de PCR específica para HPV 18 também foram utilizadas amostras de DNA de célula Hella.

Inicialmente, foi realizada a reação de PCR utilizando-se as temperaturas de anelamento descritas por Grce et al. (1997). No entanto, foi verificada a presença de

algumas bandas inespecíficas, sendo a temperatura elevada para 57°C para a PCR específica para HPV 16 e 65°C para HPV 18. As FiGs. 5 e 6 mostram a amplificação dos fragmentos de 152 e 216 pb, referentes aos produtos de PCR para os HPVs 16 e 18, respectivamente.

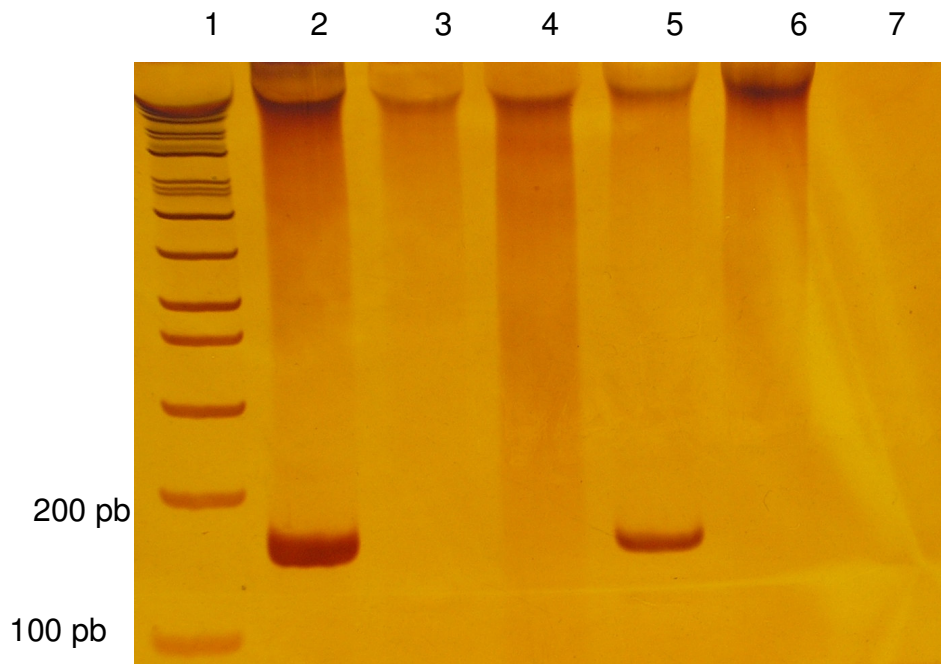


FIGURA 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado pelo nitrato de prata, apresentando o produto de PCR- HPV16.

Canaleta 1 - Padrão de peso molecular (1 kb plus DNA LADDER – GIBCO BRL® - São Paulo, SP)

Canaleta 2- Fragmento de 152 pb, correspondente à banda do fragmento amplificado de DNA de HPV 16 (Controle positivo)

Canaleta 5- Fragmento de 152 pb, correspondente à banda do fragmento amplificado de DNA de HPV 16 (Amostra positiva)

Canaletas 3, 4, e 6 - Amostras negativas para HPV 16

Canaleta 7 - Controle negativo da reação

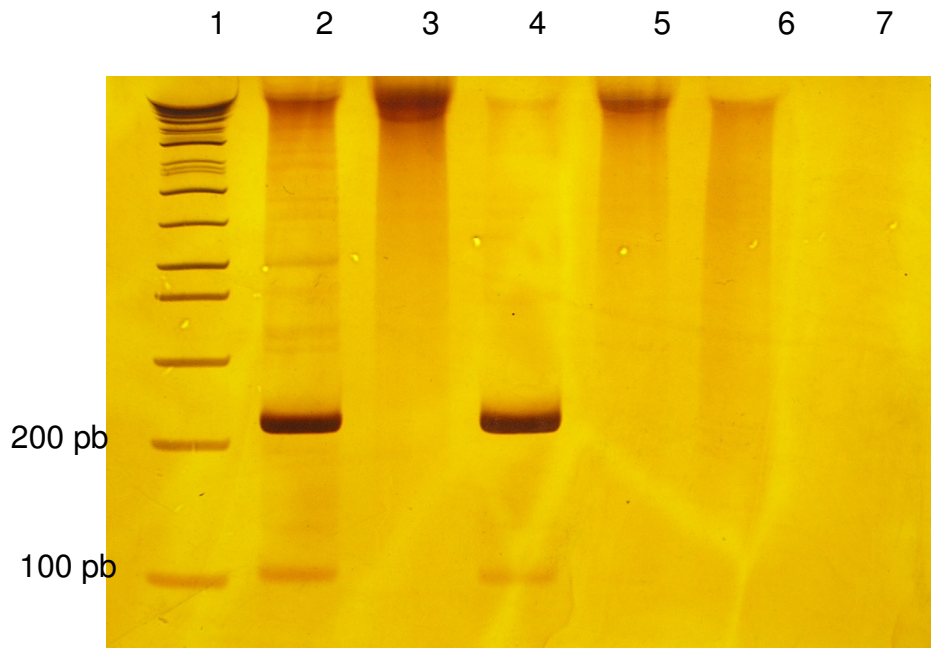


FIGURA 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado pelo nitrato de prata, apresentando o produto de PCR- HPV18.

Canaleta 1 – Padrão de peso molecular (1 kb plus DNA LADDER – GIBCO BRL® - São Paulo, SP)

Canaleta 2 - Fragmento de 216 pb, correspondente à banda do fragmento amplificado de DNA de HPV18 (controle positivo)

Canaletas 3, 5 e 6 - Amostras negativas para DNA-HPV 18

Canaleta 4- Amostra positiva para DNA-HPV 18

Canaleta 7- Controle negativo da reação

### 5.3 ACHADOS CITOPATOLÓGICOS, MOLECULARES E IMUNOCITOQUÍMICOS

Para a realização deste trabalho foram coletadas 72 amostras de pacientes com biópsia positiva para LEI ou neoplasia invasora do colo uterino e 57 amostras de pacientes com biópsia negativa para estas lesões, totalizando 129 amostras. O Apêndice 2 apresenta os resultados de todas as análises realizadas em cada uma das 129 amostras.

### 5.4 ACHADOS CITOPATOLÓGICOS

No grupo “biópsia positiva”, 62,5% das amostras estavam associadas com resultados citopatológicos positivos [ $\geq$  ASCUS/Células glandulares atípicas de significado indeterminado (AGUS)], enquanto que no grupo “biópsia negativa”, 96,5% apresentaram diagnóstico citológico negativo para estas lesões. No grupo “biópsia negativa”, uma amostra apresentou resultado de LBG e uma, LAG. No grupo “biópsia positiva”, 37,5% das amostras apresentaram resultado citopatológico negativo para estas lesões, 11,1% apresentaram diagnóstico de ASCUS/AGUS, 19,4% de LBG, 30,6% de LAG e 1,4% de carcinoma invasivo (TAB. 3). Com base nestes dados, observou-se que a sensibilidade do exame citopatológico foi de 62,5%, a especificidade de 96,5%, o valor preditivo positivo de 95,7%, o valor preditivo negativo de 67,1% e a acurácia de 77,5%. As FIGs. 7,

8, 9 e 10 ilustram a presença de ASCUS, LBG e LAG detectadas pelo exame citopatológico.

TABELA 3 - Diagnóstico citopatológico nos dois grupos estudados

Grupos	Negativo		ASCUS/AGUS		LBG		LAG		Carcinoma invasivo		Total
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
"Biópsia positiva"	27	37,5	8	11,1	14	19,4	22	30,6	1	1,4	72
"Biópsia negativa"	55	96,5	-	-	1	1,8	1	1,8	-	-	57
Total	82		8		15		23		1		129

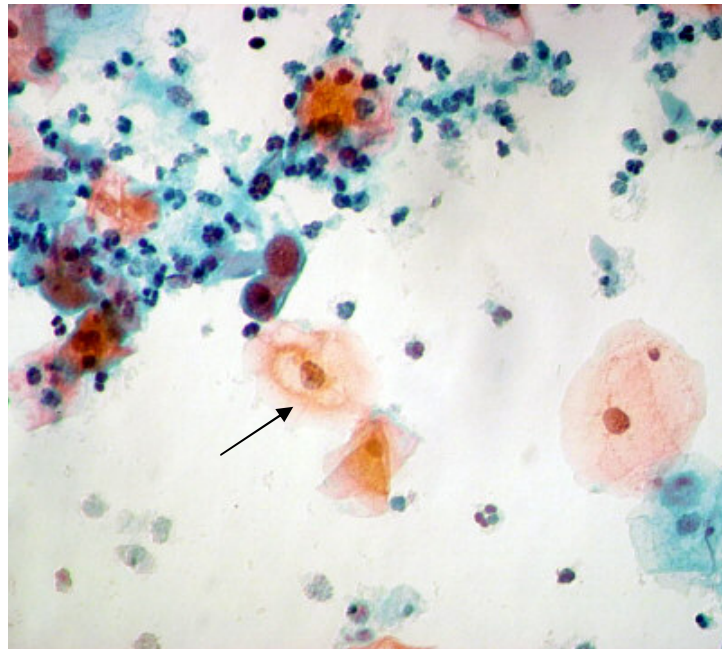


FIGURA 7- Fotomicrografia de esfregaço cervical apresentando célula escamosa com alteração compatível com ASCUS (seta). Coloração de Papanicolaou, 400X.

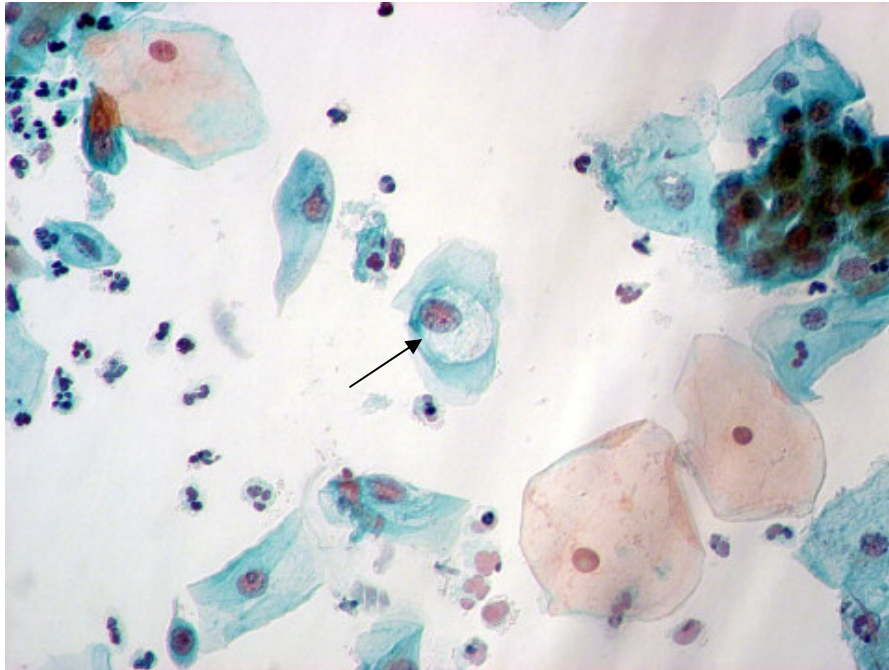


FIGURA 8 - Fotomicrografia de esfregaço cervical apresentando um coilócito (seta) no centro do campo (LBG). Coloração de Papanicolaou, 400X.

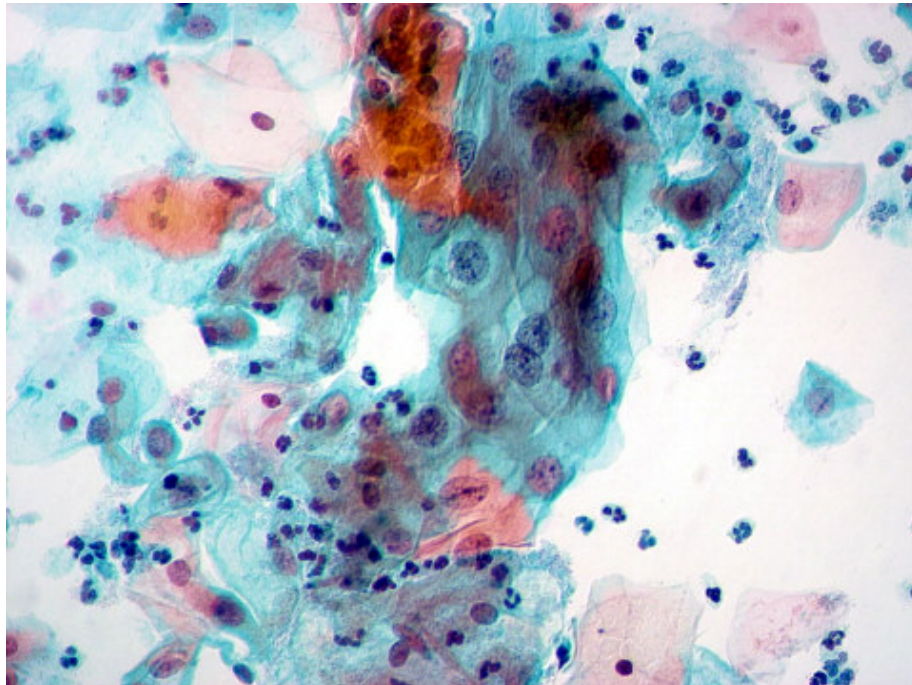


FIGURA 9 - Fotomicrografia de esfregaço cervical apresentando células escamosas, com aumento da relação núcleo/citoplasmática, compatível com LBG. Coloração de Papanicolaou, 400X.



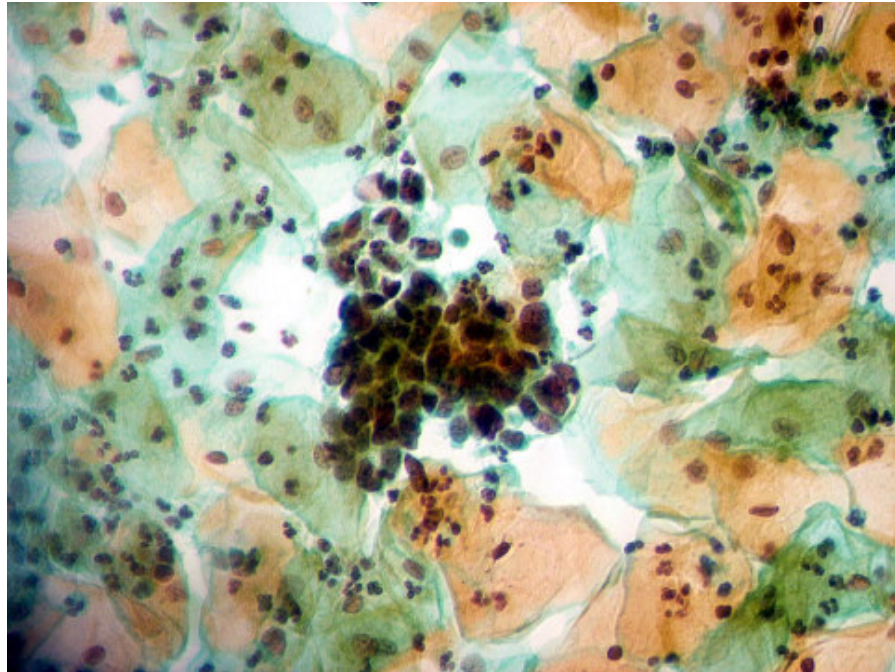


FIGURA 10 - Fotomicrografia de esfregaço cervical apresentando um grupamento de células escamosas atípicas, compatível com LAG. Coloração de Papanicolaou, 400X.

## 5.5 ACHADOS MOLECULARES

Os testes moleculares foram realizados em todas as amostras coletadas. A frequência da infecção por HPV detectada pela técnica de PCR foi de 77,8% e 22,8% nos grupos “biópsia positiva” e “biópsia negativa”, respectivamente (TAB. 4).

TABELA 4 – Resultados moleculares (PCR) nos dois grupos estudados

Grupos	DNA-HPV negativo		DNA-HPV positivo		Total	valor de p*
	n	%	n	%		
“Biópsia positiva”	16	22,2	56	77,8	72	<0,001
“Biópsia negativa”	44	77,2	13	22,8	57	
Total	60		69		129	

\* teste de Qui-quadrado de Pearson

A PCR apresentou sensibilidade de 77,8%, especificidade de 77,2%, valor preditivo positivo de 81,2%, valor preditivo negativo de 73,3% e acurácia de 77,5%, considerando a biópsia como “padrão ouro”.

Todas as amostras foram submetidas à PCRs utilizando-se os oligonucleotídeos GP5+/GP6+ como também os oligonucleotídeos específicos para HPV 16 e 18. Houve 6 amostras que não amplificaram quando utilizados os oligonucleotídeos GP5+/GP6+, mas amplificaram quando utilizados os oligonucleotídeos específicos, sendo que 3 amostras apresentaram HPV 16, 2 apresentaram HPV 18 e 1 amostra apresentou co-infecção.

## 5.6 ACHADOS IMUNOCITOQUÍMICOS

A análise imunocitoquímica foi realizada em 97 amostras, sendo 25 do grupo “biópsia negativa” e 72 do grupo “biópsia positiva”.

A reação de imunocitoquímica foi realizada de acordo com as instruções do Kit citado na seção Material e Métodos, tendo sido feita apenas uma modificação no tempo de reativação antigênica, o qual foi aumentado de 40 minutos para 1 hora. Com este protocolo, os esfregaços apresentaram fundo limpo e imunocoloração nuclear e citoplasmática bem definida.

Na análise imunocitoquímica, foi verificado que nem todas as células com alterações compatíveis com LEI ou neoplasia invasora vistas nos esfregaços apresentaram imunorreatividade para p16<sup>INK4A</sup>, ou seja, nos esfregaços das amostras com estas lesões foram visualizadas células com e sem imunorreatividade, conforme pode ser observado nas FIGs. 11 e 12.

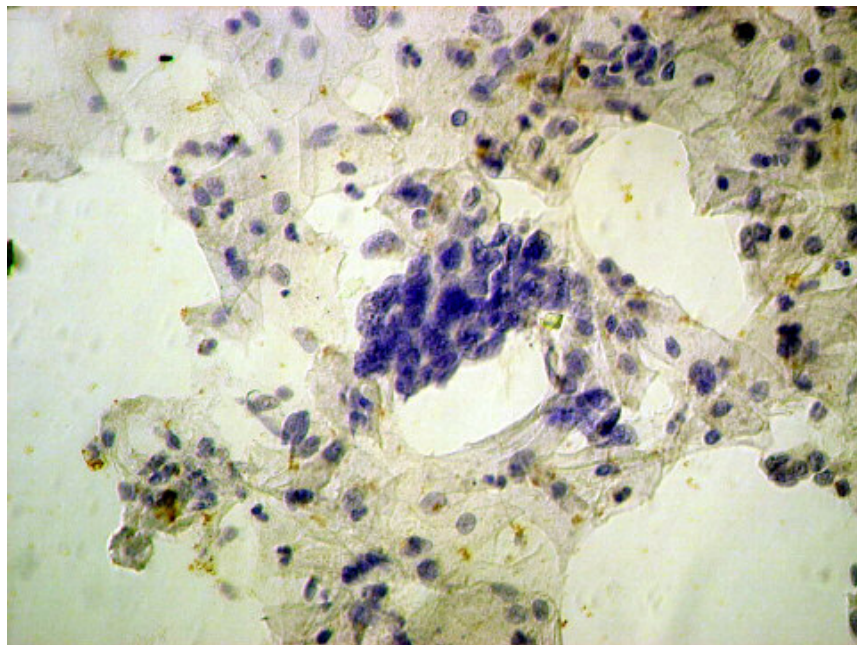


FIGURA 11 - Fotomicrografia de esfregaço cervical apresentando imunorreatividade negativa para p16<sup>INK4A</sup> em grupamento de células com alteração compatível com LAG, 400X.

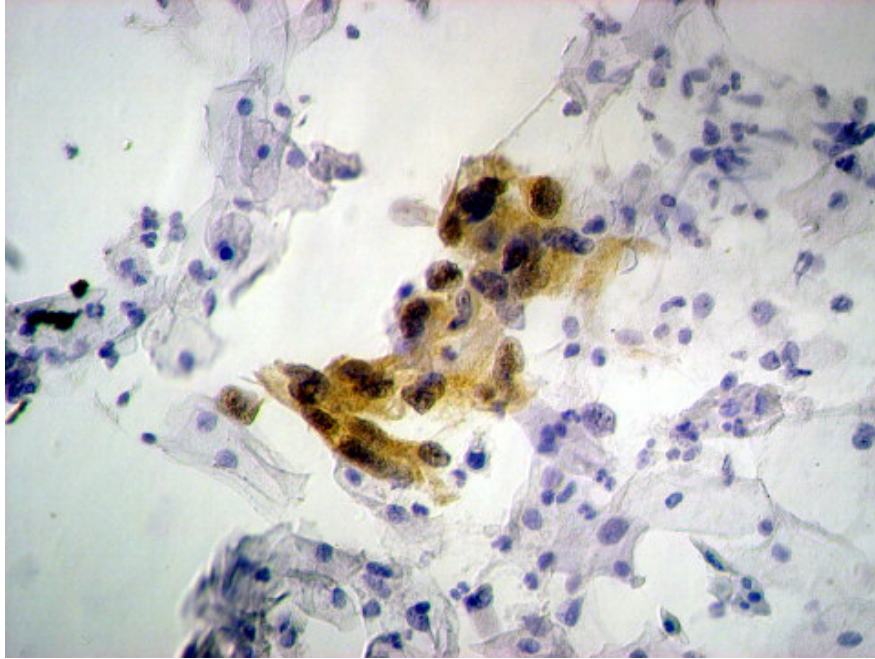


FIGURA 12 - Fotomicrografia de esfregaço cervical apresentando imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup> em grupamento de células com alteração compatível com LAG, 400X.

Observou-se também variações na intensidade da imunorreatividade para a p16<sup>INK4A</sup>, sem apresentar, no entanto, qualquer relação com o tipo e/ou alteração celular observada. As FIGs. 13 e 14 ilustram as variações da imunorreatividade para p16<sup>INK4A</sup> notadas nos esfregaços cervicais.

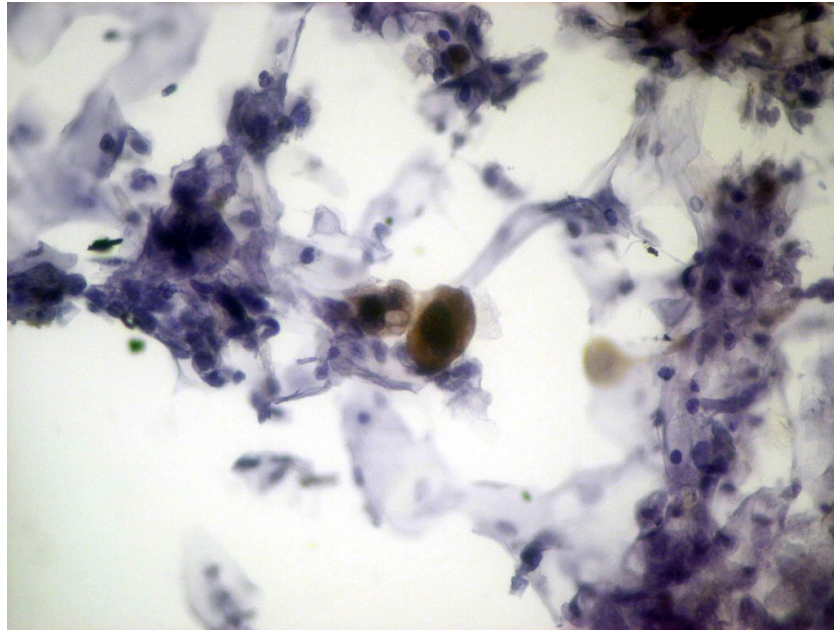


FIGURA 13- Fotomicrografia de esfregaço cervical apresentando imunorreatividade positiva forte para p16<sup>INK4A</sup> em célula com alteração compatível com LAG, 400X.

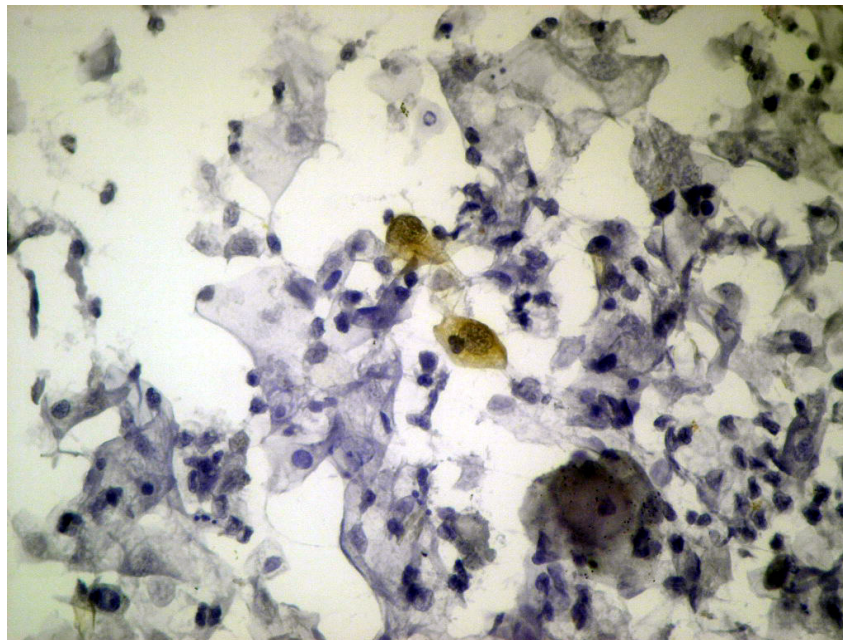


FIGURA 14 - Fotomicrografia de esfregaço cervical apresentando imunorreatividade fraca para p16<sup>INK4A</sup> em célula com alteração compatível com LAG, 400X.

Foi observada também imunorreatividade esporádica em algumas células endocervicais (FIG. 15).

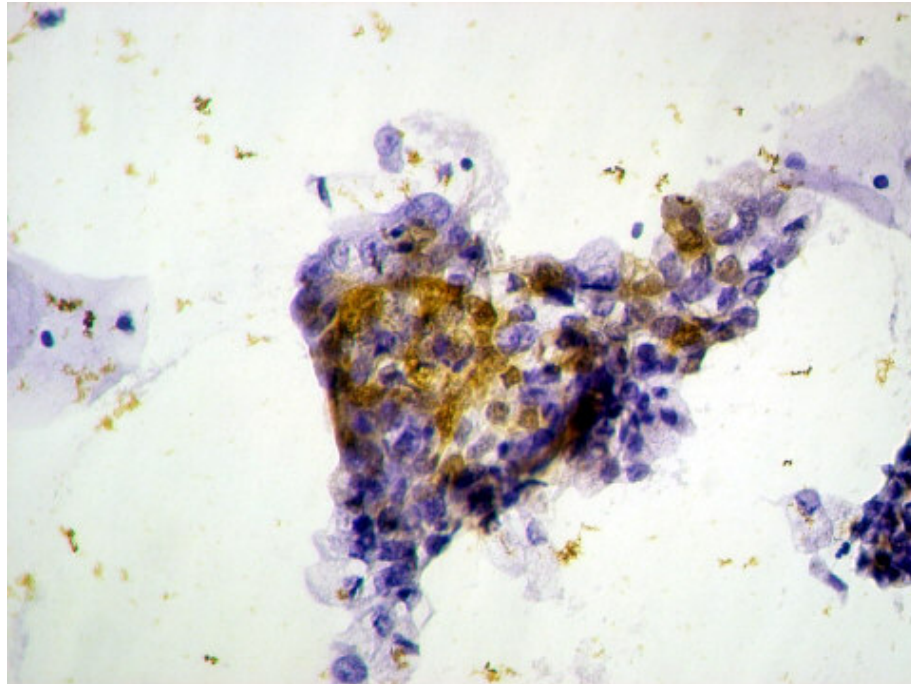


FIGURA 15 - Fotomicrografia de esfregaço cervical apresentando imunorreatividade esporádica para p16<sup>INK4A</sup> em um agrupamento de células endocervicais, 400X.

## 5.7 CORRELAÇÃO ENTRE OS ACHADOS CITOPATOLÓGICOS, MOLECULARES E IMUNOCITOQUÍMICOS

Dentre as amostras que apresentaram diagnóstico de LEI ou neoplasia invasora ao exame citopatológico, observou-se a presença de DNA de HPV em 91,5% (43/47), enquanto que nas amostras negativas para estas lesões, 31,7% apresentaram DNA-HPV detectado pela técnica de PCR (TAB. 5).

TABELA 5 - Correlação entre os resultados citopatológicos e moleculares

Citologia	DNA-HPV negativo		DNA-HPV positivo		Total	Valor de p*
	n	%	n	%		
Negativa	56	68,3	26	31,7	82	<0,001
Positiva	4	8,5	43	91,5	47	
Total	60		69		129	

\* teste de Qui-quadrado de Pearson

A TAB. 6 apresenta a correlação entre as categorias diagnósticas ao exame citopatológico e a detecção molecular de HPV.

TABELA 6 – Correlação entre as categorias diagnósticas ao exame citopatológico e a detecção molecular de HPV.

Citologia	DNA-HPV negativo		DNA-HPV positivo		Total	Valor de p*
	n	%	n	%		
Negativa	56	68,3	26	31,7	82	<0,001
ASCUS/AGUS	-	-	8	100	8	
LBG	2	13,3	13	86,7	15	
LAG	2	8,7	21	91,3	23	
Carcinoma invasivo	-	-	1	100	1	
Total	60		69		129	

\* Teste Exato de Fisher

A TAB. 7 mostra a correlação entre os resultados citopatológicos e os tipos de HPV pesquisados. Em 69,5% das amostras de LAG diagnosticadas pelo exame citopatológico foi detectada a presença de HPV 16 ou 18. Em 5 amostras de LAG o tipo de HPV não foi determinado. A amostra com diagnóstico citopatológico de carcinoma invasivo apresentou HPV 16. Dentre os casos de LBG, 40% apresentaram HPV 16 ou 18, sendo que em 46,7% das amostras o tipo viral não foi determinado. Quando se agrupa os resultados moleculares em dois grupos sendo o primeiro com amostras com presença de HPV 16 ou 18 e o segundo com amostras HPV negativas, constata-se associação estatisticamente significativa entre as categorias diagnósticas no exame citopatológico e a presença de HPV 16 ou 18 ( $p < 0,001$ ).

TABELA 7 - Correlação entre os resultados citopatológicos e os HPVs 16 e 18

Citologia	HPV negativo		HPV 16		HPV 18		HPV indeterminado		Coinfecção HPV16 e HPV 18		Total
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Negativa	56	68,3	5	6,1	5	6,1	15	18,3	1	1,2	82
ASCUS/AGUS	-	-	3	37,5	1	12,5	4	50	-	-	8
LBG	2	13,3	5	33,3	1	6,7	7	46,7	-	-	15
LAG	2	8,7	15	65,2	1	4,3	5	21,7	-	-	23
Carcinoma invasivo	-	-	1	100	-	-	-	-	-	-	1
Total	60		29		8		31		1		129



O GRÁF. 1 ilustra estes resultados.

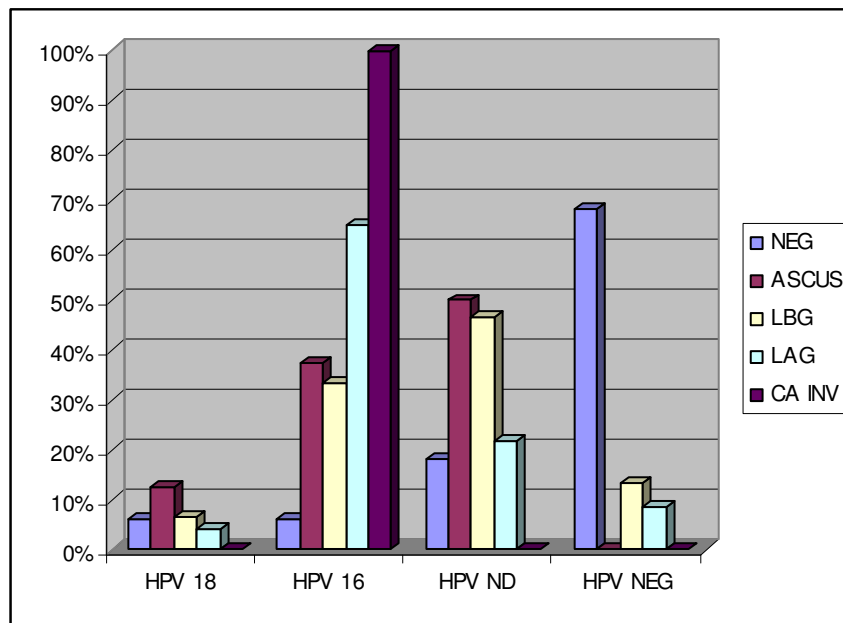


GRÁFICO 1 - Correlação entre os resultados citopatológicos e os HPVs 16 e 18

Quando se compara as categorias diagnósticas citopatológicas negativa e LAG/Carcinoma invasivo com a presença ou ausência dos subtipos virais 16 e 18, observa-se que há associação estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ;  $OR = 15,675$ ;  $IC^{OR95\%} = 5,295-46,408$ ). Sendo assim, no presente trabalho, as pacientes com diagnóstico citopatológico de LAG ou Carcinoma invasivo apresentaram uma chance de cerca de 15 vezes maior de mostrar infecção por HPV 16 ou 18, em relação às pacientes com diagnóstico citopatológico negativo para LEI ou neoplasia invasora cervical.

A TAB. 8 apresenta os resultados da imunorreatividade para  $p16^{INK4A}$  para cada categoria diagnóstica ao exame citológico, podendo-se observar que o valor de  $p$  se encontra no limite de significância. Entretanto, quando se analisa os resultados considerando-se amostras com diagnóstico citopatológico positivo e negativo para

LEI ou neoplasia invasora cervical, observa-se que a expressão aumentada da p16<sup>INK4A</sup> foi detectada em 36,2% (17/47) das amostras com diagnóstico citopatológico positivo e em 16% (8/50) daquelas com resultado negativo, observando-se associação estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ; OR=2,975; IC<sup>OR95%</sup>=1,137-7,786). E ainda, quando se compara a expressão de p16<sup>INK4A</sup> nas amostras com resultado citopatológico negativo e nas amostras com LAG, observa-se associação estatisticamente significativa entre a expressão aumentada desta proteína e a presença de LAG ( $p < 0,01$ ; OR=4,813; IC<sup>OR95%</sup>=1,580-14,661). Sendo assim, no presente estudo, as amostras com diagnóstico citopatológico de LAG apresentaram chance de cerca de 5 vezes maior de mostrar expressão aumentada de p16<sup>INK4A</sup> em relação às amostras com diagnóstico negativo para LEI ou neoplasia invasora.

TABELA 8 - Correlação entre a imunorreatividade para p16<sup>INK4A</sup> e as categorias diagnósticas ao exame citológico.

Citologia	Imunorreatividade p16 <sup>INK4A</sup> negativa		Imunorreatividade p16 <sup>INK4A</sup> positiva		Total	Valor de p*
	n	%	n	%		
Negativa	42	84	8	16	50	0,056
ASCUS/AGUS	6	75	2	25	8	
LBG	11	73,3	4	26,7	15	
LAG	12	52,2	11	47,8	23	
Carcinoma invasor	1	100	-	-	1	
Total	72		25		97	

\* Teste Exato de Fisher

O GRÁFICO 2 ilustra estes resultados.

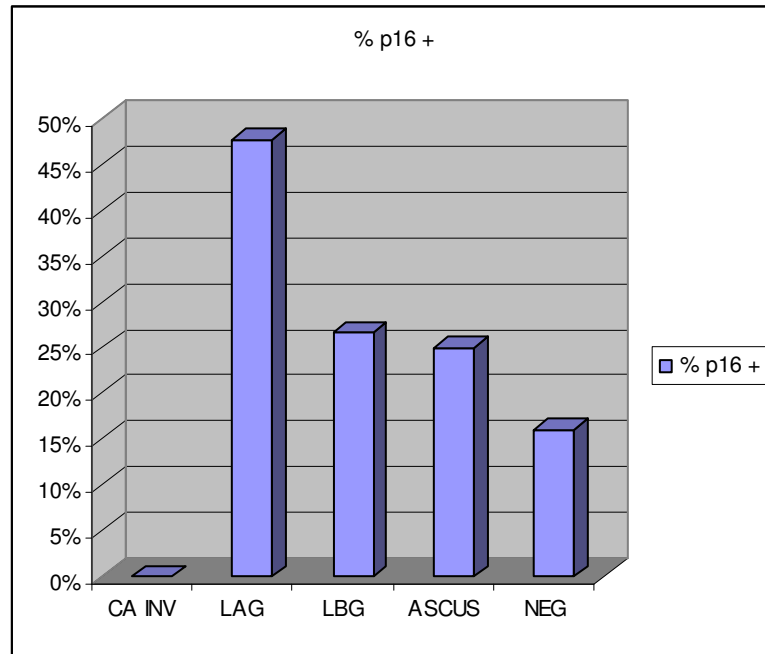


GRÁFICO 2 - Correlação entre a imunorreatividade para p16<sup>INK4A</sup> e as categorias diagnósticas ao exame citológico.

A correlação entre os resultados das análises citopatológica, molecular e imunocitoquímica está apresentada na TAB. 9.

TABELA 9 – Correlação dos achados citopatológicos, moleculares e imunocitoquímicos.

Citologia	DNA-HPV	IR-p16 <sup>INK4A</sup> negativa n (%)	IR-p16 <sup>INK4A</sup> positiva n (%)	Total n
Negativa	HPV negativo	25 (83,3)	5 (16,7%)	30
	HPV positivo	17 (85%)	3 (15%)	20
	HPV 16	3 (100%)	-	3
	HPV 18	3 (60%)	2 (40%)	5
	HPV-ND*	10 (90,9%)	1 (9,1%)	11
	Co-infecção	1 (100%)	-	1
	Total	42	8	50
ASCUS/AGUS	HPV negativo	-	-	-
	HPV positivo	6 (75%)	2 (25%)	8
	HPV 16	3 (100%)	-	3
	HPV 18	-	1 (100%)	1
	HPV-ND	3 (75%)	1 (25%)	4
	Total	6	2	8
LBG	HPV negativo	2 (100%)	-	2
	HPV positivo	9 (69,2%)	4 (30,8%)	13
	HPV 16	4 (80%)	1 (20%)	5
	HPV 18	-	1 (100%)	1
	HPV-ND	5 (71,4%)	2 (28,6%)	7
	Total	11	4	15
LAG	HPV negativo	1 (50%)	1 (50%)	2
	HPV positivo	11 (52,4%)	10 (47,6%)	21
	HPV 16	8 (53,3%)	7 (46,7%)	15
	HPV 18	1 (100%)	-	1
	HPV-ND	2 (40%)	3 (60%)	5
	Total	12	11	23
Carcinoma invasivo	HPV 16	1 (100%)	-	1
	Total	1	-	1

ND\*: tipo viral não determinado; IR-p16<sup>INK4A</sup>: imunorreatividade para p16<sup>INK4A</sup>

Verifica-se que dentre as amostras citológicas negativas, 6,0% foram HPV-DNA e p16<sup>INK4A</sup> positivas. Entre as amostras com resultado de ASCUS/AGUS, LBG e LAG, 25,0%, 26,7% e 43,5%, respectivamente, foram HPV-DNA e p16<sup>INK4A</sup> positivas. Se considerarmos apenas as amostras que foram positivas para os subtipos virais de alto risco pesquisados neste trabalho, verifica-se que, dentre as amostras citológicas negativas, 22,2% (2/9) apresentaram imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup>. Entre as amostras com resultado de ASCUS/AGUS, LBG e LAG com PCR para HPV 16 ou 18 positiva, 25% (1/4), 33,3% (2/6) e 43,8% (7/16), respectivamente, foram p16<sup>INK4A</sup> positivas.

Dentre as amostras em que foi detectado HPV 18, 44,4% apresentaram imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup>. Para as amostras com HPV 16, HPV não determinado e HPV negativo, essa positividade foi de 28,6%, 25,9% e 17,6%, respectivamente, conforme pode ser observado no GRÁF. 3. Não foi observada associação estatisticamente significativa entre a presença de HPV 16 ou 18 e a imunorreatividade para p16<sup>INK4A</sup>.

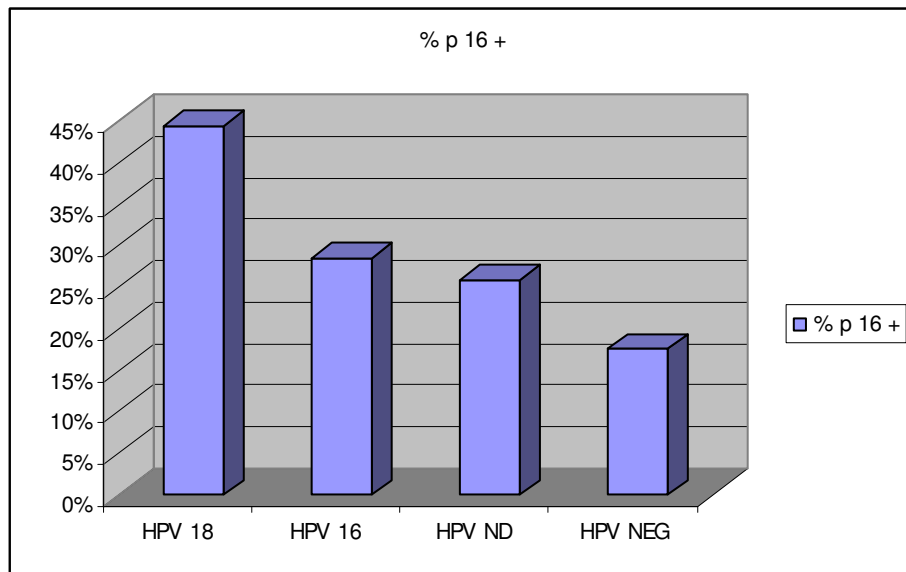


GRÁFICO 3 – Correlação entre a imunorreatividade para p16<sup>INK4A</sup> e os tipos de HPVs pesquisados

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 PADRONIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA PCR

Vários oligonucleotídeos têm sido usados para a amplificação de fragmentos de DNA de várias regiões do genoma do HPV, dentre estes estão os MY09/MY11 e GP5+/GP6+. Os estudos que utilizam estes diferentes oligonucleotídeos (BAAY et al., 1996; CARRILO et al., 2004; HARNISH et al., 1999; QU et al., 1997; REMMERBACH et al., 2004; ZEHBE; WILANDER, 1996) têm mostrado que a frequência da infecção por HPV depende da população estudada, do método usado para detecção, do espécime coletado e da técnica de coleta.

No presente trabalho, durante o re-processamento das amostras citológicas positivas e que apresentavam PCR para HPV negativa, foi observado um maior número de amostras positivas utilizando os oligonucleotídeos GP5+/GP6+, quando comparados com MY09/MY11. Além disso, notou-se menor quantidade de bandas inespecíficas no gel. Sendo assim, optou-se pela utilização de GP5+/GP6+ neste trabalho, considerando os resultados satisfatórios obtidos nas amostras testadas. Vale ressaltar que a PCR foi repetida em média 3 vezes para cada amostra, variando-se a concentração de DNA .

Carrillo et al. (2004) utilizaram os oligonucleotídeos de consenso MY09/MY11, GP5/GP6 e L1C1/L1C2 para a detecção de HPV em material de biópsia e exsudato cervical e observaram que a utilização de mais de um par de oligonucleotídeos de consenso aumenta a detecção de HPV em amostras cervicais. Estes autores

também relataram que a detecção de HPV com os oligonucleotídeos GP5/GP6 foi maior que a dos oligonucleotídeos MY09/MY11. Isso pode ser explicado pelo menor tamanho do fragmento de DNA amplificado por GP5/GP6. Assim, este oligonucleotídeo teria maior eficiência de detecção de HPV em amostras contendo DNA fragmentado. Estes autores também notaram uma maior detecção de HPV em amostras de biópsia quando comparadas com amostras de exsudato cervical.

## 6.2 ACHADOS CITOPATOLÓGICOS

No grupo “biópsia negativa”, 96,5% (55/57) das amostras apresentaram resultado citopatológico negativo para LEI ou neoplasia invasora do colo uterino. Uma amostra deste grupo apresentou resultado de LBG e uma, de LAG. Na amostra com LBG foi detectado DNA-HPV-18 e imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup>, tendo sido observadas poucas células alteradas no esfregaço citopatológico. Na amostra com LAG foi detectado DNA-HPV com subtipo viral não determinado e imunorreatividade negativa para p16<sup>INK4A</sup>, não sendo observadas células com alterações compatíveis com LAG no esfregaço em que se realizou a técnica imunocitoquímica. Estes resultados sugerem que tenha ocorrido um erro de amostragem durante a realização da biópsia.

No grupo “biópsia positiva”, 62,5% (45/72) das amostras apresentaram LEI ou neoplasia invasora ao exame citopatológico, tendo sido observada associação estatisticamente significativa entre os diagnósticos cito e histopatológico. A menor positividade encontrada no exame citopatológico pode ser explicada pela menor



sensibilidade deste método em relação à análise histopatológica. São bem conhecidos os fatores relacionados com os resultados falso-negativos do exame citopatológico, tais como erros de amostragem celular e erros de detecção. Os erros de amostragem ocorrem quando células anormais não são coletadas ou não são transferidas para o esfregaço, sendo o erro mais comum a falta de células da zona da junção escamo-colunar (DIBONITO et al., 1993; MOSTAFA et al., 2000; NANDA et al., 2000). Vale ressaltar que o diagnóstico histopatológico não foi realizado por participantes deste estudo e sim por profissionais do Serviço onde as amostras citológicas foram coletadas. Além disso, a coleta das amostras para os estudos histopatológico e citopatológico não foi realizada no mesmo dia, havendo um período máximo de 1 ano entre os dois exames, conforme relatado no item Material e Métodos. Considerando que a maioria dos casos de infecção por HPV regride espontaneamente em 6-18 meses (FERENCZY; FRANCO, 2002; TJALMA et al., 2005), a possibilidade de regressão de algumas lesões não pode ser afastada, e poderia explicar, em parte, a falta de concordância entre os resultados cito e histopatológicos. Outra possibilidade para explicar esse resultado seria o efeito da biópsia curativa, conforme relatado por outros autores (KOSS, 2006).

No presente estudo, verificou-se que a sensibilidade do exame citopatológico foi de 62,5% e a especificidade de 96,5%. Estes índices são semelhantes aos descritos na literatura. Nanda et al. (2000), em um estudo de revisão, verificaram que a sensibilidade do exame citopatológico variou de 30% a 87%, e a especificidade, de 86% a 100%.

### 6.3 ACHADOS MOLECULARES

Foi observada uma maior freqüência da infecção por HPV detectada pela técnica de PCR no grupo “biópsia positiva”, quando comparado com o grupo “biópsia negativa”. Este resultado está de acordo com o relatado na literatura, pois está bem estabelecido que o desenvolvimento destas lesões está associado com a infecção por HPV (MUNOZ, 2000; SCHIFFMAN; CASTLE, 2003).

Entretanto, foi observado que 22,2% (16/72) das amostras do grupo “biópsia positiva” apresentaram resultado negativo à PCR para HPV. Resultados semelhantes foram encontrados por Cavalcanti et al. (2000), os quais encontraram 27,9% das amostras com biópsia positiva apresentando resultado negativo para o teste de HPV.

Isto pode ocorrer devido à integração viral na região L1 do genoma do HPV, o que afetaria a região reconhecida pelos oligonucleotídeos utilizados (HUNSIK et al., 2000). Além disso, resultados falso-negativos na PCR devido à presença de inibidores de PCR endógenos ou provenientes do processamento da amostra têm sido relatados por outros autores (POLJAK et al., 2000; VINCE et al., 1998).

Dentre as amostras com biópsia positiva e PCR para HPV negativa (n=16), 75% (12/16) foram também negativas no exame citopatológico, havendo concordância entre os métodos molecular e citopatológico. O intervalo de tempo ocorrido entre a realização da biópsia e a coleta do material para o estudo

citopatológico e molecular poderia explicar, em parte, este resultado, uma vez que existem relatos de que o procedimento de biópsia pode resultar em cura das lesões.

A PCR apresentou maior sensibilidade (77,8%) e menor especificidade (77,2%) em relação ao exame citopatológico para o diagnóstico de LEI ou neoplasias invasoras do colo uterino, conforme bem documentado na literatura (FRANCO, 2003). A baixa especificidade do teste molecular em relação ao teste citológico consiste, inclusive, em uma das razões para que este teste não seja utilizado rotineiramente no rastreamento do câncer cervical. Atualmente, tem sido preconizado o uso do teste molecular apenas em condições específicas, tais como nos casos com diagnóstico de ASCUS (WRIGHT et al., 2002).

Neste estudo, 6 amostras não amplificaram quando utilizados os oligonucleotídeos GP5+/GP6+, mas amplificaram quando utilizados os oligonucleotídeos específicos, sendo que 3 amostras apresentaram HPV 16, 2 apresentaram HPV 18 e 1 amostra apresentou coinfeção. Alguns estudos têm relatado amostras com resultado negativo quando utilizados oligonucleotídeos de consenso (geral) e resultado positivo com oligonucleotídeos específicos (DEPUYDT et al., 2003; GRCE et al., 1997; HUANG et al., 2004; KARLSEN et al., 1996). Uma possível explicação para essa discordância seria o fato de que, durante a integração viral ao genoma da célula hospedeira, parte da região L1, região de amplificação dos oligonucleotídeos de consenso, poderia ser deletada. Ao utilizar oligonucleotídeos tipo-específicos homólogos a região L1, mas que difere da região de homologia dos oligonucleotídeos GP5+/GP6+, a qual pode ter sido perdida durante o processo de integração, poderia haver amplificação nessas amostras. A presença nestas amostras de variantes do HPV, os quais apesar de apresentarem homologia com os HPVs 16 e 18, apresentam alterações na região de homologia de GP5+/GP6+

também poderia explicar esses achados. Além disso, não se pode descartar a possibilidade de interferência de problemas inerentes à técnica de PCR, relacionados à sensibilidade do método.

A frequência de infecção por HPV em LEI ou neoplasias invasoras diagnosticadas ao exame citológico foi de 91,5%, sendo maior que a encontrada em outros estudos realizados no Brasil (CAMARA et al., 2003; CARMO, 2004). Entretanto, Borges et al. (2004), em estudo realizado em Belo Horizonte, utilizando a técnica de Captura Híbrida II para a detecção de HPV e exame histopatológico para a identificação de LEI ou neoplasias invasoras do colo uterino, observaram que a taxa de detecção de HPVs de alto risco oncogênico isoladamente ou associados a HPVs de baixo risco foi de 87,7% dentre as amostras com diagnóstico positivo para LEI ou neoplasias invasoras do colo uterino, observando-se positividade semelhante à encontrada no presente estudo. Quando se analisa a positividade de HPV nas categorias diagnósticas LBG, LAG e carcinoma invasivo, observa-se um aumento na positividade de HPV à medida que aumenta a gravidade da lesão, conforme observado também por outros autores (CARMO, 2004; CARRILLO et al., 2004; KALANTARI et al., 1997).

A positividade para HPV 16 ou 18 foi maior nos casos de LAG/carcinoma invasivo, quando comparados com os casos de ASCUS/AGUS (50%) e LBG (40%). Foi observado que, dentre as amostras com diagnóstico de LAG ou carcinoma invasivo, 70,8% apresentaram HPV 16 ou 18, havendo associação estatisticamente significativa entre a detecção destes subtipos virais com a presença de LAG e carcinoma invasivo. Essa associação entre a infecção por HPV de alto risco oncogênico e essas lesões cervicais é bem estabelecida na literatura (FERENCZY; FRANCO, 2002; SCHIFFMAN; CASTLE, 2003).

Grce et al. (1997), utilizando o mesmo par de oligonucleotídeos específicos para HPV 16 e 18, também observaram que a detecção de HPV 16 foi maior nas amostras de NIC III do que NIC I, sendo que 75,7% dos casos de NIC II, NIC III e NIC IV foram HPV 16 positivos. Nindl et al. (1999) também observaram aumento na detecção de HPV 16 de NIC I para NIC III, utilizando material de biópsia e PCR-EIA para tipagem viral.

O índice de detecção, em relação ao percentual de DNA-HPV-16 ou DNA-HPV-18 (70,8%) em amostras com LAG/carcinoma invasivo, é discretamente inferior ao relatado por Borges et al. (2004). Neste estudo, realizado em Belo Horizonte, Minas Gerais, foi detectado, através da técnica de Captura Híbrida II, HPV de alto risco oncogênico em 85% das amostras apresentando NICII e NICIII ao exame histopatológico. No presente trabalho, foram pesquisados apenas dois tipos de HPV de alto risco (16 e 18), enquanto que no estudo realizado por Borges et al. (2004), foi utilizado um *pool* de sondas para 13 tipos de HPVs de alto risco oncogênico. A diferença encontrada entre os dois trabalhos poderia ser explicada, em parte, pelos métodos moleculares empregados. Existe também a possibilidade de que as 5 amostras com LAG e tipo viral não determinado (vide TAB. 7) observadas no presente trabalho apresentem subtipos virais de alto risco oncogênico, resultando em aumento do índice de detecção. Outros subtipos de HPV já estão sendo pesquisados nestas amostras, dando continuidade a esta pesquisa.

Dentre os casos de LBG, 40% apresentaram HPV 16 ou 18, sendo que em 46,7% o tipo viral não foi determinado. Possivelmente, estas amostras podem conter HPVs de baixo risco ou mesmo outros subtipos de alto risco, ainda não pesquisados nestas amostras.

Em relação ao HPV 18, foram detectadas oito amostras positivas no presente estudo, sendo que 5 delas apresentaram resultado citopatológico negativo para LEI e/ou neoplasias invasoras do colo uterino. As outras três amostras positivas para HPV 18 apresentaram, cada uma, diagnóstico citológico de AGUS/não excluindo a possibilidade de adenocarcinoma, LBG e LAG. Apesar do HPV 18 estar mais associado com lesões glandulares (ANDERSSON et al., 2001; ANDERSSON et al., 2003), este subtipo viral também tem sido observado em amostras apresentando LBG ou até mesmo em amostras citológicas negativas (CARVALHO et al., 2005).

Dentre as amostras que apresentaram resultado citopatológico negativo para LEI ou neoplasia invasora do colo uterino, 31,7% apresentaram DNA-HPV detectado pela técnica de PCR. Esta frequência foi maior do que a encontrada em um estudo realizado em Porto Alegre, Brasil, no qual Nonnenmacher et al. (2002) encontraram uma prevalência de HPV de 13,8% em pacientes apresentando resultado citopatológico negativo para LEI ou neoplasia invasora do colo uterino. Entretanto, em dois estudos realizados em Belo Horizonte (BORGES et al., 2004; CAMPOS et al., 2005), a frequência de DNA-HPV em amostras negativas variou de 23,7% a 44%.

#### 6.4 ACHADOS IMUNOCITOQUÍMICOS

Foi observado que nem todas as células com alterações compatíveis com LEI ou neoplasia invasora vistas nos esfregaços apresentaram imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup>. Verificou-se ainda variação na intensidade da imunorreatividade, sem apresentar, no entanto, qualquer relação com o tipo e/ou alteração celular observada. Outros autores observaram também variação na imunorreatividade da p16<sup>INK4A</sup> por vezes relacionada com o grau da lesão observada (BIBBO et al., 2002; SANO et al., 1998).

No presente trabalho, observou-se que a imunorreatividade para p16<sup>INK4A</sup> foi positiva em 25% das amostras com ASCUS/AGUS, 26,7% em LBG e em 47,8% das amostras com LAG. Apesar dos índices detectados terem sido inferiores ao relatado por outros autores (BIBBO et al., 2002; EKALAKSANANAN et al., 2006; LONGATTO FILHO et al., 2005; NIEH et al., 2005; PIENTONG et al., 2004; SAHEBALI et al., 2006; SAQI et al., 2002) verifica-se que a imunorreatividade aumentou à medida que aumentava a gravidade da lesão diagnosticada ao exame citopatológico, sendo, este aspecto, concordante com outros trabalhos da literatura (ISHIKAWA et al., 2006; VOLGAREVA et al., 2004).

## 6.5 CORRELAÇÃO ENTRE OS ACHADOS CITOPATOLÓGICOS, MOLECULARES E IMUNOCITOQUÍMICOS

No presente estudo, dentre as amostras com diagnóstico citológico de LAG, foi observado imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup> em 47,8% (11/23) das amostras, sendo que dentre as 11 amostras positivas, 7 foram HPV-16 positivas, 3 HPV indeterminado e 1 HPV negativa. Apenas uma amostra com diagnóstico citológico de carcinoma invasivo foi observada, na qual se detectou HPV-16 e imunorreatividade negativa para p16<sup>INK4A</sup>. Assim, dentre as 24 amostras com LAG ou carcinoma invasivo, 45,8% (11/24) apresentaram imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup>, observando-se associação estatisticamente significativa entre a presença de LAG ou carcinoma invasivo e a imunorreatividade para p16<sup>INK4A</sup>. Entretanto, a positividade encontrada no presente trabalho foi inferior ao que tem sido descrito em outros estudos relatados na literatura. Em diferentes estudos, foi observada positividade para p16<sup>INK4A</sup> variando entre 78,6% e 100% em amostras com diagnóstico de LAG ou carcinoma invasivo, sendo que a maioria dos estudos mostra positividade próxima de 100% (BIBBO et al., 2002; EKALAKSANANAN et al., 2006; PIENTONG et al., 2004; SAHEBALI et al., 2006; SAQI et al.; 2002).

Entretanto, alguns trabalhos têm apresentado número significativo de NIC de alto grau com imunorreatividade negativa para p16<sup>INK4A</sup>. Em estudo realizado por Volgareva et al. (2004), dentre as amostras com NIC II, 31,6% (12/38) apresentaram



imunorreatividade fraca, esporádica ou focal e, dentre as amostras com NIC III, 54,2% (13/24) apresentaram imunorreatividade esporádica, focal ou difusa e 12,5% (3/24) imunorreatividade fraca. Quando se considera os casos de NIC II e NIC III em conjunto (LAG), observa-se que a positividade total foi de 45,2% (28/62), índice semelhante ao encontrado no presente trabalho para as amostras com LAG (47,8%). Os autores deste estudo sugerem que essa diferença nos resultados em relação aos outros pode ser devida ao pequeno número de amostras analisadas, à utilização de diferentes tipos de anticorpos monoclonais e ainda, aos critérios distintos usados pelos diferentes grupos de pesquisa para a interpretação dos resultados.

Este último item deve ser ressaltado, uma vez que não existe uma padronização quanto aos critérios utilizados em relação à contagem das células imunoreativas, especialmente em estudos realizados em esfregaços citológicos. Resultados contraditórios encontrados poderiam ser atribuídos, por exemplo, ao fato de que alguns autores consideram, na contagem celular, a presença de imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup> em células com alteração reativa benigna, em células metaplásicas ou em células endocervicais, enquanto que em outros estudos, a imunorreatividade presente nestas células é considerada como coloração inespecífica. Apenas o acompanhamento destas pacientes permitiria uma avaliação do significado destas células apresentando expressão aumentada da p16<sup>INK4A</sup>, porém sem anormalidades compatíveis com lesão originada por HPV de alto risco oncogênico.

Tem-se tentado estabelecer uma relação direta entre o grau da displasia cervical e intensidade de coloração de p16<sup>INK4A</sup>. Entretanto, existe uma variabilidade significativa nas percentagens relatadas dos graus de NIC que são p16 positivos. A

maioria dos estudos relata coloração negativa ou mínima em biópsias cervicais normais ou reativas, com maior variabilidade no número de LBG que são p16 positivas. Wang et al. (2004) verificaram que a aplicação de um *cut-off* mais rigoroso em relação à coloração difusa como resultado positivo para NIC II diminuiu a sensibilidade (de 97% para 81,1%) e aumentou a especificidade (de 68,5 para 95,4%), quando comparando com a aplicação de um *cut-off* de coloração esporádica/focal como resultado positivo. Possíveis explicações para tal heterogeneidade na imunorreatividade de p16<sup>INK4A</sup> são a variabilidade intra e interobservador na classificação morfológica das NIC, a falta de padronização na graduação da imunorreatividade de p16 (coloração nuclear e/ou citoplasmática, positivo X negativo, distribuição dentro do epitélio), além de diferenças no clone do anticorpo utilizado (KALOF; COOPER, 2006).

A menor imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup> encontrada no presente trabalho poderia ser atribuída à falta de representatividade de células alteradas no esfregaço submetido à imunocitoquímica, bem como ao tempo de armazenamento prolongado das células no meio líquido em que foram coletadas. Dentre as 13 amostras com diagnóstico de LAG ou carcinoma invasivo e com imunorreatividade negativa para p16<sup>INK4A</sup>, 6 não apresentaram células alteradas no esfregaço submetido à imunocitoquímica. Duas apresentaram células alteradas, porém, o tempo de armazenamento destas amostras foi superior a 120 dias. Sahebalí et al. (2006) observaram algumas amostras de citologia em meio líquido com LAG e imunorreatividade negativa para p16<sup>INK4A</sup>, sugerindo que a baixa celularidade e o armazenamento em líquido preservativo contendo água (em vez de etanol) por longo período fossem as causas desses resultados falso-negativos. Estes autores também sugerem que a padronização metodológica, incluindo a técnica de detecção, a

interpretação dos resultados, o estabelecimento de um valor limiar para o número de células imunoreativas acima do qual a amostra será considerada positiva e a utilização de diferentes fluidos preservativos é necessária para um melhor desempenho da imunocitoquímica.

Outro aspecto a ser considerado em relação à menor positividade de expressão de p16<sup>INK4A</sup> em relação aos índices descritos na literatura, refere-se ao método de citologia em meio líquido usado no presente trabalho. O sistema DNA Citoliq<sup>®</sup> (DIGENE) consiste em um método de preparação manual, diferentemente dos sistemas semi-automatizados (SurePath) e automatizados (ThinPrep) usados na maioria dos trabalhos referenciados. Dentre 19 trabalhos em que imunorreatividade para p16<sup>INK4A</sup> foi avaliada, 12 foram realizados com material de biópsia, 5 com citologia e 2 com biópsia mais citologia. Dentre os 7 trabalhos realizados em citologia, apenas 1 utilizou o sistema DNA Citoliq<sup>®</sup> (DIGENE) para citologia em meio líquido (LONGATTO FILHO et al., 2005), 2 utilizaram citologia convencional, 2 utilizaram o sistema ThinPrep, 1 SurePath e 1 citologia convencional mais citologia em meio líquido. Existem diferenças no processamento destes métodos, bem como nas soluções fixadoras/preservativas dos líquidos onde as células coletadas são armazenadas, o que poderia interferir na reação de imunocitoquímica.

Dentre todas as amostras que apresentaram DNA-HPV 16 ou 18, 33,3% (12/36) mostraram expressão aumentada de p16<sup>INK4A</sup>, não sendo observada associação estatisticamente significativa entre a presença destes subtipos virais e a expressão aumentada de p16<sup>INK4A</sup>. No entanto, diante da pesquisa de outros subtipos virais de alto risco, possivelmente encontraríamos um aumento do número de amostras com imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup> associadas a HPV de alto risco, tendo em vista que em 7 amostras imunoreativas, o subtipo viral não foi

determinado, e 3 estavam associadas a LAG. Entre as amostras positivas para DNA-HPV 16 ou 18, 66,7% (24/36) não mostraram expressão aumentada de p16<sup>INK4A</sup>. No estudo realizado por Lambert et al. (2006) também foram observadas amostras p16 negativas, mas HPV positivas (2 LBG, 1 LAG), sugerindo-se que possa existir um mecanismo de degradação da p16 após sua tradução, contribuindo para a perda da expressão. Além disso, mutação e deleção de p16 em neoplasia cervical têm sido descrito como um evento raro e a metilação de p16 pode ser mecanismo de perda de p16.

A presença de HPV de alto risco também tem sido detectada em amostras negativas para LEI ou neoplasia cervical e que são p16<sup>INK4A</sup> negativas. É possível que a p16<sup>INK4A</sup> seja um marcador da atividade oncogênica do HPV em células do epitélio cervical, indicando interferência avançada das oncoproteínas virais com proteínas celulares envolvidas na regulação do ciclo celular (NEGRI et al., 2004). Assim, a presença de HPV de alto risco transitório e em pequena carga viral pode não ser suficiente para desencadear o aparecimento de lesões cervicais, já que outros fatores também são necessários para que a lesão cervical se desenvolva.

Dentre as amostras com diagnóstico citológico de ASCUS/AGUS (n=8), 6 apresentaram imunorreatividade negativa para p16<sup>INK4A</sup> e 2, positiva, sendo todas HPV positivas. Dentre as amostras p16<sup>INK4A</sup> positivas, uma apresentou diagnóstico de ASCUS ao exame citopatológico e HPV indeterminado ao teste molecular, e a outra AGUS e HPV 18. Dentre as amostras com imunorreatividade negativa, 3 apresentaram HPV 16 e em 3 amostras o subtipo viral não foi determinado. Cabe ressaltar que para aquelas 3 amostras HPV 16 positivas e p16 negativas o tempo de armazenamento médio antes da realização da técnica imunocitoquímica foi de 168 dias. A positividade para p16<sup>INK4A</sup> observada nas amostras com ASCUS/AGUS no

presente estudo (25%) foi menor do que a descrita em diferentes trabalhos na literatura, a qual variou de 52,5 a 62% (EKALAKSANANAN et al., 2006; LONGATTO FILHO et al., 2005; NIEH et al., 2005; PIENTONG et al., 2004). No entanto, o número de amostras com diagnóstico de ASCUS/AGUS foi pequeno, sendo necessário um maior número de amostras para a interpretação destes resultados.

No presente estudo, dentre as 15 amostras com diagnóstico citológico de LBG, 11 apresentaram imunorreatividade negativa para p16<sup>INK4A</sup>, sendo que em 9 delas detectou-se DNA-HPV (4 HPV-16 e 5 HPV indeterminado), indicando que a pesquisa imunocitoquímica de p16<sup>INK4A</sup> não identificou esses casos. Estudos têm mostrado que a afinidade da proteína E7 do HPV 6 (baixo risco oncogênico) para ligação à pRb é menor do que a da proteína E7 do HPV 16 (alto risco oncogênico) (GAGE et al., 1990). Considerando que cerca de 60% dos casos de LBG são negativos para HPV de alto risco (KOSS, 2006) não se pode excluir a possibilidade de que as 5 amostras com subtipos virais não determinados não expressaram imunorreatividade para p16<sup>INK4A</sup> porque estariam associadas com HPVs de baixo risco, não pesquisados neste trabalho. Dentre as 4 amostras com imunorreatividade positiva para esta proteína, todas foram HPV positivas na PCR (1 HPV 16, 1 HPV 18 e 2 HPV indeterminado). Em diferentes trabalhos na literatura realizados com amostras citológicas, a positividade de p16<sup>INK4A</sup> nos casos de LBG variou de 54,3 a 74% (BIBBO et al., 2002; EKALAKSANANAN et al., 2006; PIENTONG et al., 2004; SAQI et al., 2002) e em biópsia, de 14 a 100% (AGOFF et al., 2003; ISHIKAWA et al., 2006; MURPHY et al., 2005; VOLGAREVA et al., 2004). Em um trabalho de revisão, Kalof e Cooper (2006) relataram a heterogeneidade da imunorreatividade de p16<sup>INK4A</sup> nas lesões com NIC I. É possível que a LBG que mostre expressão aumentada desta proteína apresente maior proporção de integração viral, podendo a

p16<sup>INK4A</sup> ser um potencial marcador de LBG com risco de progressão. Entretanto, sua utilidade neste grupo ainda não está bem estabelecida.

No presente estudo, detectou-se que, dentre as amostras HPV negativas, 17,6% (6/34) apresentaram imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup>. Destas, 5 amostras foram negativas e uma mostrou LAG na análise citopatológica.

Em diferentes estudos realizados em biópsias e em amostras citológicas, foi observada imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup> variando de 0 a 11,5% em amostras com diagnóstico negativo para LEI ou neoplasia invasora do colo uterino (AGOFF et al., 2003; EKALAKSANANAN et al., 2006; MURPHY et al., 2005; PIENTONG et al., 2004). Em um estudo realizado no Brasil com amostras de citologia em meio líquido, foi observado que dentre 55 amostras HPV negativas e com citologia negativa, 6 apresentaram imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup> (LONGATTO FILHO et al., 2005).

A presença de imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup> e pesquisa de DNA-HPV negativa também tem sido detectada em amostras com diagnóstico de NIC e carcinomas invasivos, o que poderia sugerir a atuação de mecanismos independentes de HPV responsáveis pelo aumento da expressão da p16<sup>INK4A</sup> (LAMBERT et al., 2006; LIN et al., 2005).

O estudo de Murphy et al. (2005) sugere que a expressão aumentada de p16<sup>INK4A</sup> poderia ser devido à perda da repressão transcricional decorrente de mutações no gene Rb, independente do HPV, pois, neste estudo, foram observadas amostras com lesão cervical com imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup>, mas negativas para HPV. Além disso, a hipermetilação do gene Rb também tem sido apontada como um fator que poderia levar a expressão aumentada de p16<sup>INK4A</sup> na ausência de infecção por HPV (LIN et al., 2005; NIEH et al., 2005).

Embora o teste de Papanicolaou desempenhe um papel importante no rastreamento das lesões cervicais, ele apresenta limitações no que se refere à sensibilidade e especificidade do diagnóstico. Vários estudos têm revelado que uma grande percentagem de amostras contendo HPV de alto risco regredirá, mostrando que a especificidade e o valor preditivo positivo da detecção de HPV de alto risco permanece baixa. No intuito de melhorar a acurácia diagnóstica, esforços vêm sendo feitos para identificar um marcador complementar para o rastreamento das lesões cervicais. Dentre eles destaca-se a pesquisa da p16<sup>INK4A</sup>, a qual vem sendo sugerida para compensar a falta de especificidade do teste molecular para a detecção do HPV de alto risco.

No presente trabalho, a expressão aumentada da p16<sup>INK4A</sup> esteve presente em 45,8% das amostras com LAG/carcinoma invasor, notando-se aumento gradativo da sua expressão à medida que aumentava a gravidade da lesão. Portanto, a pesquisa de p16<sup>INK4A</sup> poderia ser útil como ferramenta complementar para a identificação de lesões epiteliais escamosas mais graves. Em 33,3% das amostras com HPVs de alto risco oncogênico 16 ou 18 houve expressão aumentada da p16<sup>INK4A</sup>, não sendo constatada associação entre a expressão de p16<sup>INK4A</sup> e os subtipos virais de alto risco pesquisados neste trabalho. Entretanto, outros subtipos já estão sendo investigados nestas amostras e pesquisas adicionais permitiriam verificar se existem diferenças entre a expressão aumentada de p16<sup>INK4A</sup> e diferentes subtipos virais de alto risco oncogênico.

## 7 CONCLUSÕES

Foram avaliados os dados citopatológicos, moleculares e imunocitoquímicos de 129 amostras cervicais obtidas de pacientes provenientes de dois serviços públicos de Belo Horizonte, que apresentavam resultado histopatológico anterior positivo ou negativo para LEI ou neoplasia invasora do colo uterino. Realizou-se a pesquisa de DNA-HPV e dos tipos virais 16 e 18 pela técnica de PCR e correlacionou-se estes resultados com o diagnóstico citopatológico e a expressão imunocitoquímica da proteína p16<sup>INK4A</sup> em esfregaços cervicais. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. A presença de DNA-HPV foi detectada em 91,5% das amostras positivas ( $\geq$  ASCUS/AGUS), havendo associação estatisticamente significativa entre os diagnósticos molecular e citopatológico.
2. A detecção de HPV -16 ou HPV-18 foi verificada em 70,83% das amostras com LAG/carcinoma invasor, em 40% das amostras com LBG e em 50% dos casos de ASCUS/AGUS, confirmando a importância do HPV na etiologia do câncer cervical e de suas lesões precursoras, especialmente dos tipos de alto risco oncogênico.
3. Dentre as amostras em que foi detectado HPV-18, 44,4% apresentaram imunorreatividade positiva para p16<sup>INK4A</sup>. Para as amostras com HPV-16, HPV não determinado e HPV negativo, essa positividade foi de 28,6%, 25,9% e



17,6%, respectivamente, não se constatando associação estatisticamente significativa entre a expressão aumentada da p16<sup>INK4A</sup> e os tipos virais de alto risco oncogênico pesquisados neste trabalho.

4. A imunorreatividade para p16<sup>INK4A</sup> foi detectada em 47,8% das amostras com LAG, em 26,7% naquelas com LBG, em 25% com ASCUS/AGUS e em 16% das amostras com diagnóstico citopatológico negativo. As pacientes com diagnóstico de LAG apresentaram chance cerca de 5 vezes maior de apresentar imunorreatividade de p16<sup>INK4A</sup> em relação às pacientes com diagnóstico citopatológico negativo.
5. Estes dados sugerem que a pesquisa imunocitoquímica da p16<sup>INK4A</sup> em esfregaços cervicais poderia ser utilizada como ferramenta complementar na identificação de lesões epiteliais escamosas mais graves. No entanto, a pesquisa de outros tipos virais seria interessante para verificar a possibilidade de associação ou não com a expressão aumentada da imunorreatividade da p16<sup>INK4A</sup> em esfregaços cervicais.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOFF, S. N. et al. P16<sup>INK4A</sup> expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Modern Pathology*, Baltimore, v. 16, n. 7, p. 665-673, 2003.

AMRANI, M. et al. Molecular detection of human papillomavirus in 594 uterine cervix samples from Moroccan women (147 biopsies and 447 swabs). *Journal of Clinical Virology*, Amsterdam, v. 27, n. 3, p.286-295, 2003.

ANDERSSON, S. et al. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. *European Journal of Cancer*, New York, v. 37, n. 2, p. 246-250, 2001.

ANDERSSON, S. et al. Types of human papillomavirus revealed in cervical adenocarcinomas after DNA sequencing. *Oncology Reports*, Athens, v. 10, n. 1, p. 175-179, 2003.

ARROSSI, S.; SANKARANARAYANAN, R.; PARKIN, D. M. Incidence and mortality of cervical cancer in Latin América. *Salud pública de México*, Mexico, v. 45, n. 3, p. 306-314, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14724: informação e documentação – trabalhos acadêmicos – apresentação. Rio de Janeiro, ago 2002.

\_\_\_\_\_. NBR 6023: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, ago 2002.

\_\_\_\_\_. NBR 10520: apresentação de citação em documentos. Rio de Janeiro, ago 2002.

BAAY, M. F. D. et al. Comprehensive study of several general and type-specific primers pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 34, n. 3, p. 745-747, 1996.

BIBBO, M. et al. Procedure for immunocytochemical detection of p16<sup>INK4A</sup> antigen in thin-layer, liquid-based specimens. *Acta Cytologica*, Chicago, v. 46, n. 1, p. 25-29, 2002.

BORGES, S. C. V. et al. Taxa de detecção do Papilomavírus Humano pela captura híbrida II, em mulheres com neoplasia intra-epitelial cervical. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 105-110, 2004.

BOSCH, F. X. et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cancer cervical (IBSCC). *Journal of the National Cancer Institute*, Bethesda, v. 87, n. 11, p. 796-802, 1995.

CAMARA, G. N. L. et al. Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 98, n. 7, p. 879-883, 2003.

CAMPOS, R. R. et al. Prevalência do papilomavírus humano e seus genótipos em mulheres portadoras e não-portadoras do vírus da imunodeficiência humana. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 248-256, 2005.

CARMO, B. B. *Estudo comparativo entre a citologia convencional e a citologia em meio líquido na detecção de lesões escamosas intraepiteliais e invasoras do colo uterino associadas à infecção pelo papilomavírus humano*. 2004. 123 f. (Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2004.

CARRILLO, A. et al. Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del vírus del papiloma humano em cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. *Salud Pública de México*, Mexico, v. 46, n. 1, p. 7- 15, 2004.

CARVALHO, M. O. O. et al. Human papillomavirus infection in Rio de Janeiro, Brazil: a retrospective study. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, Salvador, v. 9, n. 5, p. 398-404, 2005.

CASTLE, P. E. et al. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *Journal of the National Cancer Institute*, Bethesda, v. 97, n. 14, p. 1066-1071, 2005.

CAVALCANTI, S. M. B. et al. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. *The Journal of Infection*, London, v.40, n. 1, p. 80-87, 2000.

CRUM, C. P. Contemporary theories of cervical carcinogenesis: the virus, the host and the stem cell. *Modern Pathology*, Baltimore, v. 13, n. 3, p. 243-251, 2000.

DAKOCYTOMATION *CINtec™ p16<sup>INK4A</sup> Cytology Kit*. Disponível em : <<http://www.dakocytomation.com>> Acesso em: outubro de 2004.

DANIEL, W. W. Estimation. In: \_\_\_\_\_. *Bioestatics: a foundation for analysis in the health sciences*, 3 ed. New York; Chichester: John Wiley, 1983, Cap. 5, p. 121-157.

DEPUYDT, C. E. et al. Thin-layer liquid-based cervical cytology and PCR for detecting and typing human papillomavirus DNA in Flemish women. *British Journal of Cancer*, Edinburgh, v. 88, n. 4, p. 560-566, 2003.

DIBONITO, L. et al. Cervical cytopathology. An evaluation of its accuracy based on cytohistologic comparison. *Cancer*, Hoboken, v. 72, n. 10, p. 3002-3006, 1993.

EKALAKSANANAN, T. et al. Usefulness of combining testing for p16 protein and human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma screening. *Gynecologic Oncology*, New York, v. 103, n. 1, p. 62-66, 2006.

ELUF-NETO, J. et al. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Brasilian Journal of Cancer*, v. 69, n. 1, p. 114-119, 1994.

FERENCZY, A.; FRANCO, E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *The Lancet Oncology*, London, v. 3, n. 1, p. 11-16, 2002.

FRANCO, E. L. Primary screening of cervical cancer with human papillomavirus tests. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, Bethesda, v. 31, p. 89-96, 2003.

GAGE, J. R.; MEYERS, C.; WETTSTEIN, F. O. The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV 6b) and of the oncogenic HPV 16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *Journal of Virology*, Washington, v. 64, n. 2, p. 723-730, 1990.

GOMPEL, C; KOSS, L. Lesões pré-cancerosas malpighianas do colo uterino. In:\_\_\_\_\_. *Citologia Ginecológica e suas bases anatomoclínicas*. São Paulo: Editora Manole, 1997, Cap.9, p. 79-105.

GRCE, M. et al. Detection and typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction in cervical scrapes of Croatian women with abnormal cytology. *European Journal of Epidemiology*, Rome, v. 13, n. 6, p. 645-651, 1997.

GUIMARÃES, M. C. M. et al. Immunohistochemical expression of p16<sup>INK4A</sup> and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Seattle, v. 53, n. 4, p. 509-516, 2005.

HARNISH, D. G. et al. Evaluation of human papillomavirus-consensus primers for HPV detection by the polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, London, v. 13, n. 1, p. 9-21, 1999.

HUANG, L. W. et al. Multiple HPV genotypes in cervical carcinomas: improved DNA detection and typing in archival tissues. *Journal of Clinical Virology*, Amsterdam, v. 29, n. 4, p. 271-276, 2004.

HUBBARD, R. A. Human Papillomavirus testing methods. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, Chicago, v. 127, n. 8, p. 940-945, 2003.

HUNSIK, K. et al. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *Journal of Virological Methods*, Amsterdam, v. 88, n. 2, p. 125-134, 2000.

HUSMAN, A. M. R. et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology*, London, v. 76, n. 4, p. 1057-1062, 1995.

HWANG, T. S. et al. Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray. *Gynecologic Oncology*, New York, v. 90, n. 1, p. 51-56, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. INCA. *Câncer do colo do útero*. Disponível em:< <http://www.inca.gov.br>> . Acesso: novembro de 2006.

ISHIKAWA, M. et al. Overexpression of p16<sup>INK4A</sup> as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. *International Journal of Gynecological Cancer*, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 347-353, 2006.

KALANTARI, M. et al. Human Papillomavirus findings in relation to cervical intraepithelial neoplasia grade: a study on 476 stockholm women, using PCR for detection and typing of HPV. *Human Pathology*, Philadelphia, v. 28, n. 8, p. 899-904, 1997.

KALOF, A. N.; COOPER, K. P16<sup>INK4A</sup> immunoexpression: Surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Advances in Anatomic Pathology*, New York, v. 13, n. 4, p. 190-194, 2006.

KANAO, H. et al. Correlation between p14<sup>ARF</sup>/p16<sup>INK4A</sup> expression and HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Letters*, Amsterdam, v. 213, n. 1, p. 31-37, 2004.

KARLSEN, F. et al. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 34, n. 9, p. 2095-2100, 1996.

KEATING, J. T.; INCE, T.; CRUM, C. P. Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis. *Advances in Anatomic Pathology*, New York, v. 8, n. 2, p. 83-92, 2001.

KHAN, M. J. et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *Journal of the National Cancer Institute*, Bethesda, v. 97, n. 14, p. 1072-1079, 2005.

KIM, J. W. et al. Absence of p15<sup>INK4B</sup> and p16<sup>INK4A</sup> gene alterations in primary cervical carcinoma tissues and cell lines with human papillomavirus infection. *Gynecologic Oncology*, New York, v. 70, n. 1, p. 75-79, 1998.

KOSS, L. G. Squamous carcinoma of the uterine cervix and its precursors. In: \_\_\_\_\_. *Diagnostic cytology and its histopathologic bases*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. Cap. 11, p.282-318.

LAMBERT, A. P. F.; ANSCHAU, F.; SCHMITT, V. M. p16<sup>INK4A</sup> expression in cervical premalignant and malignant lesions. *Experimental and Molecular Pathology*, San Diego, v. 80, n. 2, p. 192-196, 2006.

LANGOSCH, K. M.; RIETHDORF, S. Role of cell-cycle regulatory proteins in gynecological cancer. *Journal of Cellular Physiology*, Philadelphia, v. 196, n. 2, p. 224-244, 2003.

LIN, Z. H. et al. Human papillomavirus genotyping by oligonucleotide microarray and p16<sup>INK4A</sup> expression in uterine cervical intraepithelial neoplasm and in invasive carcinoma in Korean women. *Pathology International*, Victoria, v. 55, n. 8, p. 491-496, 2005.

LODISH, H. et al. Cancer. In: \_\_\_\_\_. *Molecular cell biology*. 5<sup>th</sup> ed. New York: W. H. Freeman, 2004. Cap. 23, p.956-960.

LONGATTO FILHO, A. et al. Immunocytochemical expression of p16<sup>INK4A</sup> and Ki-67 in cytologically negative and equivocal pap smears positive for oncogenic human papillomavirus. *International Journal of Gynecological Pathology*, Hagerstown, v. 24, n. 2, p. 118-124, 2005.

LORENZATO, F. et al. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). *International Journal of Gynecological Cancer*, Cambridge, v. 10, n. 2, p. 143-150, 2000.

LORENZATO, M. et al. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? *Human Pathology*, Philadelphia, v. 36, n. 10, p. 1101-1107, 2005.

MANOS, M.M. et al. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cell*, New York, v. 7, p. 209-214, 1989.

MOSTAFA, M. G., SRIVANNABOON, S., RACHANAWUTANON, M. Accuracy of cytological findings in abnormal cervical smears by cytohistologic comparison. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*, Chandigarh, v. 43, n. 1, p. 23-29, 2000.

MOTOYAMA, S. et al. The role of human papillomavirus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *The Kobe Journal of Medical Sciences*, Kobe, v. 50, n.1, p. 9-19, 2004.

MUÑOZ, N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *Journal of Clinical Virology*, Amsterdam, v. 19, n.1-2, p. 1-5, 2000.

MURPHY, N. et al. P16<sup>INK4A</sup> positivity in benign, premalignant and malignant cervical glandular lesions: a potential diagnostic problem. *Virchows Archiv*, Berlin, v. 445, n. 6, p. 610-615, 2004.

MURPHY, N. et al. p16<sup>INK4A</sup>, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology*, London, v. 58, n. 5, p. 525-534, 2005.

NANDA, K. et al. Accuracy of the papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Annals of Internal Medicine*, Philadelphia, v. 132, n. 10, p. 810-819, 2000.

NEGRI, G. et al. P16<sup>INK4A</sup> expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Archiv*, Berlin, v. 445, n. 6, p. 616-620, 2004.

NIEH, S. et al. Is p16<sup>INK4A</sup> expression more useful than human papillomavirus test to determine the outcome of atypical squamous cells of undetermined significance-categorized Pap smear? A comparative analysis using abnormal cervical smears with follow-up biopsies. *Gynecologic Oncology*, New York, v. 97, n. 1, p. 35-40, 2005.

NINDL, I. et al. Distribution of 14 high risk HPV types in cervical intraepithelial neoplasia detected by a non-radioactive general primer PCR mediated enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Pathology*, London, v. 52, n. 1, p. 17-22, 1999.

NOMENCLATURA brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas: recomendações para profissionais de saúde. 2. ed., Rio de Janeiro: *Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer*, 2006.

NONNENMACHER, B. et al. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 95-100, 2002.

NORONHA, V. et al. Human papillomavirus associated with uterine cervix lesions. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v. 32, n. 3, p. 235-240, 1999.

O'NEILL, C. J., CLUGGAGE, W. G. P16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Advances in Anatomic Pathology*, New York, v. 13, n. 1, p. 8-15, 2006.



PIENTONG, C. et al. Immunocytochemical staining of p16<sup>INK4A</sup> protein from conventional pap test and its association with human papillomavirus infection. *Diagnostic Cytopathology*, New York, v. 31, n. 4, p. 235-242, 2004.

POLJAK, M.; SEME, K.; GALE, N. Rapid extraction of DNA from archival clinical specimens: our experiences. *Pflugers Archiv – European Journal of Physiology*, Berlin, v. 439, n. 3, p. 42-44, 2000.

QU, W. et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primers systems. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 35, n. 6, p. 1304-1310, 1997.

REMMERBACH, T. W. et al. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *Journal of Clinical Virology*, Amsterdam, v. 30, n. 4, p. 302-308, 2004.

RICHART, R. M. et al. Human papillomavirus IAC Task Force Summary. *Acta Cytologica*, Chicago, v. 42, n. 1, p. 50-58, 1998.

RIVOIRE, W. A. et al. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Rio de Janeiro, v. 47, n. 2, p. 179-184, 2001.

ROCCO, J. W.; SIDRANSKY, D. P16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Experimental Cell Research*, New York, v. 264, n. 1, p. 42-55, 2001.

SAHEBALI, S. et al. Immunocytochemistry in liquid-based cervical cytology: analysis of clinical use following a cross-sectional study. *International Journal of Cancer*, New York, v. 118, n. 5, p. 1254-1260, 2006.

SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, Cambridge, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

SANO, T. et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *American Journal of Pathology*, Bethesda, v. 153, n. 6, p. 1741-1748, 1998.

SANTOS, S. H. et al. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 98, n. 2, p. 181-184, 2003.

SAQI, A. et al. Overexpression of p16<sup>INK4A</sup> in liquid-based specimens (surepath™) as marker of cervical dysplasia and neoplasia. *Diagnostic Cytopathology*, New York, v. 27, n.6, p. 365-370, 2002.

SCHIFMAN, M.; CASTLE, P.E. Human papillomavirus epidemiology and public health. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, Chicago, v. 127, n. 8, p. 930-934, 2003.

SCHNEIDER, A. et al. Sensitivity of the cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV-DNA hybridization studies. *Diagnostic Cytopathology*, New York, v. 3, n. 3, p. 250-255, 1987.

SCHORGE, J. O. et al. P16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Saint Louis, v. 190, n. 3, p.668-673, 2004.

SOLOMON, D. et al. The 2001 Bethesda System- Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, Chicago, v. 287, n. 16, p. 2114-2119, 2002.

SOUZA, N. S. T.; MELO, V. H.; CASTRO, L. P. F. Diagnóstico da infecção pelo HPV em lesões do colo do útero em mulheres HIV+: acuidade da histopatologia. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, São Paulo, v. 23, n. 6, p. 355-361, 2001.

TJALMA, W. A. A. et al. Role of human papillomavirus in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, London, v. 19, n. 4, p. 469-483, 2005.

TRIPATHI, A. et al. Alterations of the p16 gene in uterine cervical carcinoma from Indian patients. *International Journal of Gynecological Cancer*, Cambridge, v. 13, n. 4, p. 472-479, 2003.

VILLA, L. L. et al. An approach to human papillomavirus identification using low stringency single specific primer PCR. *Molecular and Cellular Probes*, London, v. 9, n. 1, p. 45-48, 1995.

VINCE, A.; POLJAK, M., SEME, K. DNA extraction from archival Giemsa-stained bone-marrow slides: comparison of six rapid methods. *British Journal of Haematology*, Oxford, v. 101, n. 2, p. 349-351, 1998.

VOLGAREVA, G. et al. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer*, London, v. 4, p. 1-10, Aug 2004.

WANG, S. S. et al. Validation of p16<sup>INK4A</sup> as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, Philadelphia, v. 13, n. 8, p. 1355-1360, 2004.

WRIGHT, T. C. et al. 2001 Consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, Chicago, v. 287, n. 16, p. 2120-2129, 2002.

YOSHINOUCI, M. et al. Alteration of the CDKN2/p16 gene is not required for HPV-positive uterine cervical cancer cell lines. *International Journal of Oncology*, Athens, v. 16, n. 3, p. 537-541, 2000.

ZEHBE, I.; WILANDER, E. Two consensus primer systems and nested polymerase chain reaction for human papillomavirus detection in cervical biopsies: a study of sensitivity. *Human Pathology*, Philadelphia, v. 27, n. 8, p. 812-815, 1996.

ZIELINSKI, G. D. et al. The presence of high-risk HPV combined with specific p53 and p16<sup>INK4A</sup> expression patterns points to high-risk HPV as the main causative agent for adenocarcinoma *in situ* and adenocarcinoma of the cervix. *Journal of Pathology*, Sussex, v. 201, n. 4, p. 535-543, 2003.

## 9 APÊNDICES

### APÊNDICE 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido

#### TIPAGEM MOLECULAR DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO E ESTUDO IMUNOCITOQUÍMICO DA P16<sup>INK4A</sup> EM PACIENTES COM E SEM LESÕES ESCAMOSAS INTRA-EPITELIAIS E INVASORAS DE COLO UTERINO.

Prezada Senhora,

A senhora está sendo convidada a participar de um estudo que será desenvolvido na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais que tem por finalidade estudar as alterações da infecção pelo Papilomavírus Humano no colo uterino e detectar o tipo viral.

Para sua participação no estudo, durante o exame ginecológico realizado pelo médico ginecologista, serão colhidas amostras contendo células do colo uterino. O exame não apresenta risco algum à saúde, sendo realizado de rotina em muitos exames ginecológicos. Nesta coleta, serão utilizados materiais de coleta descartáveis e de boa qualidade.

Os dados clínicos e o material coletado serão usados somente para esta pesquisa, e os resultados serão mantidos em sigilo. Seu nome e sua participação na pesquisa não serão divulgados.

O resultado do seu exame será encaminhado ao médico ginecologista que tomará as medidas necessárias para seu tratamento, caso seja necessário.

Os exames serão gratuitos e não haverá compensação financeira na sua participação nesta pesquisa.

Caso você tenha alguma dúvida sobre o estudo, poderá contatar as pesquisadoras deste estudo, Dra. Paula Ávila Fernandes e/ou Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes, pelos telefones 3499-6879 ou 3499-6884, na Faculdade de Farmácia da UFMG, localizada na Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 4º andar, salas 4090 e 4116 bloco 3.

Acredito ter sido suficientemente esclarecida a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim descrevendo o estudo: Tipagem molecular do papilomavírus humano e estudo imunocitoquímico da p16<sup>INK4A</sup> em pacientes com anormalidades epiteliais do colo uterino, e estou de acordo em participar desta pesquisa.

---

Assinatura da paciente/representante legal

Data

---

Assinatura da testemunha

Data

## APÊNDICE 2 - Resultados das análises realizadas nas amostras coletadas

Número	HPV	Citologia	Tipagem	Biópsia	P16
01	Positivo	LAG	HPV 16	NIC III	Negativo
02	Positivo	LAG	HPV X	NIC III	Negativo
03	Positivo	LBG	HPV X	NIC II	Negativo
04	Positivo	Negativo	HPV 16	NIC II	Negativo
05	Positivo	ASCUS	HPV 16	NIC II	Negativo
06	Positivo	LAG	HPV 16	NIC III	Negativo
07	Positivo	LBG	HPV X	NIC III	Negativo
08	Positivo	AGUS	HPV 18	NIC III	Positivo
09	Positivo	LBG	HPV X	NIC I	Negativo
10	Positivo	LBG	HPV 16	NIC III	Negativo
11	Negativo	Negativo	HPV negativo	NIC I	Negativo
12	Positivo	LBG	HPV 16	NIC III	Positivo
13	Positivo	Negativo	HPV X	NIC II	Negativo
14	Positivo	ASCUS	HPV X	NIC I	Negativo
15	Positivo	LAG	HPV 16	NIC III	Negativo
16	Positivo	LAG	HPV 16	NIC III	Negativo
17	Positivo	LAG	HPV 16	NIC III	Negativo
18	Positivo	LAG	HPV 16	NIC III	Positivo
19	Positivo	Negativo	HPV X	NIC II	Negativo
20	Positivo	Negativo	HPV 16	NIC III	Negativo
21	Positivo	Negativo	HPV X	NIC III	Negativo
22	Positivo	LAG	HPV X	NIC III	Positivo
23	Positivo	Negativo	HPV X	Negativo	Negativo
24	Positivo	Negativo	HPV X	NIC I	Negativo
25	Positivo	LBG	HPV X	NIC I	Positivo
26	Negativo	Negativo	HPV negativo	NIC I	Negativo
27	Positivo	Negativo	HPV X	NIC I	Negativo
28	Positivo	LAG	HPV 16	NIC III	Positivo
29	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	Negativo
30	Positivo	LBG	HPV 18	Negativo	Positivo
31	Positivo	Negativo	Coinfecção	NIC I	Negativo
32	Positivo	LAG	HPV 16	NIC II	Positivo
33	Positivo	Negativo	HPV 18	NIC I	Negativo
34	Negativo	LBG	HPV negativo	NIC I	Negativo
35	Negativo	Negativo	HPV negativo	NIC I	Negativo
36	Positivo	LBG	HPV X	NIC I	Positivo
37	Negativo	Negativo	HPV negativo	NIC III	Negativo
38	Positivo	ASCUS	HPV X	NIC III	Negativo
39	Negativo	LAG	HPV negativo	NIC III	Positivo
40	Positivo	LAG	HPV 16	NIC III	Negativo
41	Positivo	LBG	HPV 16	NIC I	Negativo
42	Negativo	Negativo	HPV negativo	NIC I	Negativo
43	Positivo	Negativo	HPV 18	NIC I	Negativo
44	Positivo	Negativo	HPV X	NIC II	Negativo
45	Positivo	Negativo	HPV X	Negativo	Positivo
46	Positivo	Negativo	HPV 18	Negativo	Positivo
47	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	Negativo
48	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	Positivo
49	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	Positivo
50	Positivo	ASCUS	HPV X	NIC I	Negativo
51	Positivo	ASCUS	HPV 16	NIC I	Negativo
52	Negativo	Negativo	HPV negativo	NIC I	Negativo
53	Positivo	LAG	HPV 16	Ca microinvasor	Positivo
54	Negativo	Negativo	HPV negativo	NIC I	Negativo
55	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	Negativo
56	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	Negativo
57	Positivo	Negativo	HPV 18	Negativo	Positivo
58	Positivo	Negativo	HPV 18	Negativo	Negativo
59	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	Positivo
60	Positivo	Negativo	HPV X	Negativo	-
61	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
62	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
63	Positivo	Negativo	HPV 16	Negativo	-
64	Negativo	Negativo	HPV negativo	NIC I	Negativo
65	Positivo	ASCUS	HPV 16	NIC I	Negativo
66	Positivo	LAG	HPV 16	NIC III	Positivo
67	Positivo	LAG	HPV 16	NIC III	Positivo

68	Negativo	Negativo	HPV negativo	NIC I	Positivo
69	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
70	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
71	Negativo	LBG	HPV negativo	NIC III	Negativo
72	Positivo	Negativo	HPV 16	NIC III	Negativo
73	Positivo	Negativo	HPV X	NIC II	Negativo
74	Positivo	LBG	HPV X	NIC II	Negativo
75	Positivo	LBG	HPV 16	NIC III	Negativo
76	Positivo	LBG	HPV X	NIC I	Negativo
77	Positivo	ASCUS	HPV X	NIC III	Positivo
78	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
79	Positivo	LAG	HPV X	NIC III	Positivo
80	Negativo	Negativo	HPV negativo	NIC I	Negativo
81	Positivo	Ca invasor	HPV 16	NIC III	Negativo
82	Positivo	LAG	HPV 18	NIC II	Negativo
83	Negativo	Negativo	HPV negativo	NIC II	Negativo
84	Positivo	LAG	HPV 16	NIC III	Positivo
85	Positivo	LBG	HPV 16	NIC II	Negativo
86	Positivo	LAG	HPV 16	NIC II	Negativo
87	Positivo	LAG	HPV 16	NIC III	Negativo
88	Positivo	LAG	HPV X	NIC II	Positivo
89	Positivo	Negativo	HPV X	NIC I	Negativo
90	Negativo	Negativo	HPV negativo	NIC I	Negativo
91	Positivo	Negativo	HPV X	NIC I	Negativo
92	Negativo	LAG	HPV negativo	NIC III	Negativo
93	Positivo	Negativo	HPV X	Negativo	-
94	Positivo	LAG	HPV X	Negativo	Negativo
95	Positivo	Negativo	HPV X	Negativo	-
96	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
97	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
98	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
99	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
100	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
101	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
102	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
103	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
104	Positivo	Negativo	HPV 16	Negativo	-
105	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
106	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
107	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
108	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
109	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
110	Positivo	Negativo	HPV X	Negativo	-
111	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
112	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
113	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
114	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
115	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
116	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	Negativo
117	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	Positivo
118	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
119	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	Negativo
120	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	Negativo
121	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	Negativo
122	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	Negativo
123	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	Negativo
124	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	Negativo
125	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	Negativo
126	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
127	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	-
128	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	Negativo
129	Negativo	Negativo	HPV negativo	Negativo	Negativo

ASCUS: Células escamosas atípicas de significado indeterminado

AGUS: Células glandulares atípicas de significado indeterminado

LBG: Lesão escamosa intraepitelial de baixo grau

LAG: Lesão escamosa intraepitelial de alto grau

Ca microinvasor: Carcinoma microinvasor

Ca invasor: Carcinoma invasor

HPV X: tipo viral não determinado

NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

- : não realizado

## 10 ANEXO

**Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP)**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP


**Parecer nº. ETIC 381/05**

**Interesse: Profa. Paula Ávila Fernandes**  
**Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 23 de novembro de 2005, o projeto de pesquisa intitulado « **Tipagem molecular do papilomavírus humano e estudo imunocitoquímico da p16<sup>INK4A</sup> em pacientes com anormalidades epiteliais do colo uterino** » bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
**Presidente do COEP/UFMG**