

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE P16<sup>INK4A</sup>, KI67 E RECEPTORES DE  
ESTROGÊNIO E PROGESTERONA EM LESÕES DO COLO UTERINO, SUA  
ASSOCIAÇÃO COM INFECÇÃO PELO PAPILOMAVIRUS HUMANO E SEUS  
CORRELATOS EPIDEMIOLÓGICOS**

**LUCIANE CALIL MYLIUS**

**Orientadora: Dra. Mary Clarisse Bozzetti**

**Porto Alegre**

**2008**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE P16<sup>INK4A</sup>, KI67 E RECEPTORES DE  
ESTROGÊNIO E PROGESTERONA EM LESÕES DO COLO UTERINO, SUA  
ASSOCIAÇÃO COM INFECÇÃO PELO PAPILOMAVIRUS HUMANO E SEUS  
CORRELATOS EPIDEMIOLÓGICOS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Medicina: Ciências Médicas,  
como parte dos Pré-requisitos para obtenção  
do Título de Doutor**

**LUCIANE CALIL MYLIUS**

**Orientadora: Dra. Mary Clarisse Bozzetti**

**Porto Alegre**

**2008**

"A alegria do triunfo jamais poderia ser experimentada se não existisse a  
luta, que é a que determina a oportunidade de vencer."

**González Pecotche**

## **DEDICATÓRIA**

À minha filha Nathalia, pelo seu amor, carinho e, pela compreensão, nos inúmeros momentos de  
ausência,

Ao meu marido Gilney, pelo apoio e incentivo,

Aos meus pais Walter (in memoriam) e Iolanda, pela educação e formação,

A Tita, pela sua presença carinhosa,

Aos meus Irmãos, Simone e Eduardo, por acreditarem...

## AGRADECIMENTOS

Difícil tarefa esta... Tanta gente para lembrar e agradecer...

Ao programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas pela oportunidade de realizar o programa em uma Universidade pública e gratuita.

Aos professores do PPG, pelos ensinamentos recebidos.

Às minhas orientadoras Dr.<sup>as</sup> Mary Bozzetti e Dra Maria Isabel Edelweiss pelo apoio incansável e presença constante,

À Dra Luise Meurer pelo auxílio na leitura das lâminas e correções,

Aos funcionários do Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisas do HCPA, Neiva Coppetti e Jorge Lopes, pela atenção, carinho e apoio,

Aos funcionários do Laboratório Edelweiss, em especial ao Leandro, pela disponibilidade,

À Equipe de profissionais do Posto Jardim Leopoldina, pela colaboração e auxílio na coleta dos dados,

As minhas companheiras de pesquisa, Beth, Cris, Regina, Marilda, Lisiane pelos momentos agradáveis de árduo trabalho e de descontração,

A direção da Faculdade de Farmácia e meus colegas de departamento pelo incentivo,

Aos meus amigos, pela compreensão e apoio.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACO: Anticoncepcional Oral

ACI: Anticoncepcional Injetável

APC: Célula Apresentadora de Antígeno

ATP: Adenosina Tri-fosfato

ASC-US: Atipia escamosa de significado indeterminado

ASC-H: Atipia escamosa de significado indeterminado suspeita de lesão intra-epitelial de alto grau

AGC: Atipia cervical glandular

CA: Carcinoma

CDK-ciclina: Cinase Dependente de Ciclina

CH II: Captura Híbrida II

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DST: Doença sexualmente transmissível

EGF: *Endothelial Growth Factor*

Fase G1: Fase pré-síntese de DNA no ciclo celular

Fase S : Fase de síntese de DNA no ciclo celular

Fase G2: Fase de pré-mitose do ciclo celular

Fase M: Fase de mitose do ciclo celular

TNF: *Tumour Necrosis Fator*

HE: Hematoxilina e eosina

HIV: Vírus da Imunodeficiência humana

HPV: Papilomavírus Humano

HR-HPV: Papilomavírus humano de alto risco carcinogênico

HSIL: Lesão Intra-Epitelial Escamosa de Alto Grau

IHQ: Imuno-histoquímica

Ig: Imunoglobulina

INCA: Instituto Nacional do Câncer

IL: Interleucina

Ki67: Antígeno de Proliferação Celular

LCR: Long Control Region (Região de Controle Viral)

LR-HPV: Papilomavírus humano de baixo risco carcinogênico

LSAB: Complexo estreptavidina-biotina

LOH: Perda de Heterozigidade

LSIL: Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau

MPF: Mitosis Promoter Fator

MHC: Complexo Maior de Histocompatibilidade

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical

NIC 1: Neoplasia intra-epitelial cervical grau 1

NIC 2: Neoplasia intra-epitelial cervical grau 2

NIC 3: Neoplasia intra-epitelial cervical grau 3

PCNA: Antígeno Nuclear de Proliferação Celular

PCR: Reação em cadeia da polimerase

p16<sup>INK4a</sup>: Proteína 16 inibidora da quinase dependente de ciclina

pRb: Proteína do retinoblastoma

RE: Receptor de Estrogênio

RP: Receptor de Progesterona

RB: Gene do retinoblastoma

RFLP: Fragmentos por enzimas de restrição

RNA: Ácido Ribonucléico

RNAm: RNA mensageiro

RIPA: Radioimuno de precipitação

RT-PCR: Transcriptase Reversa

SIDA: Síndrome da imunodeficiência adquirida

Th: Célula T helper: Auxiliares

VLPs: Vírus Like particles (Proteínas Semelhantes à vírus)

WHO: World Health Organization

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Tabela 1	artigo em português – pág. 100
	artigo em inglês – pág. 134
Tabela 2	artigo em português – pág. 101
	artigo em inglês – pág. 135
Tabela 3	artigo em português – pág. 103
	artigo em inglês – pág. 137

### ARTIGO 2

Tabela 1	artigo em português – pág. 164
	artigo em inglês – pág. 188
Tabela 2	artigo em português – pág. 168
	artigo em inglês – pág. 192
Tabela 3	artigo em português – pág. 169
	artigo em inglês – pág. 193
Tabela 4	artigo em português – pág. 170
	artigo em inglês – pág. 194

### ARTIGO 3

Tabela 1	artigo em português – pág. 212
	artigo em inglês – pág. 247
Tabela 2	artigo em português – pág. 216
	artigo em inglês – pág. 251

Tabela 3	artigo em português – pág. 219 artigo em inglês – pág. 254
Tabela 4	artigo em português – pág. 223 artigo em inglês – pág. 257
Tabela 5	artigo em português - 220 artigo em inglês – pág. 254
Tabela 6	artigo em português – pág. 220 artigo em inglês – pág. 255
Tabela 7	artigo em português – pág. 221 artigo em inglês – pág. 255

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização genômica do HPV-16 .....	26
Figura 2: Expressão Gênica Espacial e Temporal do HPV de Alto Risco .....	28
Figura 4: Evolução da infecção: de transitória a permanente.....	32
Figura 5: Co-fatores envolvidos na carcinogênese do colo uterino.....	38
Figura 6: Hiperchromasia .....	51
Figura 7: Binucleação.....	51
Figura 8: Coilocitos .....	52
Figura 9: Imagem colposcópica de neoplasia.....	54
Figura 10: Etapas do ciclo celular .....	63
Figura 11: Expressão Nuclear Forte de Ki67 (400x).....	66
Figura 12: Alterações nos genes celulares nas infecções HPV induzidas.....	73
Figura 13: Expressão forte e focal da p16INK4A em lâmina de citologia (nuclear e citoplasmática).....	77
Figura 14: Expressão forte e difusa da p16INK4a (100x) em corte histológico de colo uterino com HSIL. ....	78



1.5. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	49
1.5.1. DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO .....	49
1.5.2. COLPOSCOPIA:.....	53
1.5.3. TÉCNICAS MOLECULARES .....	55
1.5.3. OUTRAS TÉCNICAS DE DETECÇÃO:.....	60
1.5.4. IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ):.....	61
2. A CARCINOGENESE E O PAPILOMAVÍRUS HUMANO:.....	62
2.1. CICLO CELULAR.....	62
2.2. ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR: KI67 (MIB-1).....	64
2.3. GENES SUPRESSORES TUMORAIS .....	67
3. HPV, CICLO CELULAR E A PROTEÍNA P16 INK4A:.....	69
3.1. ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE O PAPEL DA p16 INK4A E SUA IMPORTÂNCIA NO COLO UTERINO .....	74
4. RELEVÂNCIA: .....	84
5. OBJETIVOS:.....	86
6. CONSIDERAÇÕES ACERCA DOS RESULTADOS APRESENTADOS NESTA TESE DE DOUTORADO .....	87
Artigo 1: EXPRESSÃO DE p16INK4a, Ki67, E RECEPTORES HORMONAIS: RELAÇÃO COM PAPILOMAVÍRUS HUMANO E CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS. ....	89

Article 1: EXPRESSION OF P16, KI67 AND HORMONE RECEPTORS IN UTERINE CERVICAL LESIONS AND THEIR EPIDEMOLOGICAL CORRELATES.....	124
Artigo 2: “CO-INFECÇÃO de Chlamydia trachomatis(CT) e Papilomavírus humano (HPV): ASSOCIAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE p16INK4a e Ki67 EM BIÓPSIAS DE PACIENTES COM E SEM LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS.....	158
Article 2: Chlamydia trachomatis (CT) AND HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) CO-INFECTION: ASSOCIATION WITH P16INK4A AND KI67 EXPRESSION IN BIOPSIES OF PATIENTS WITH PRE-NEOPLASTIC AND NEOPLASTIC LESIONS .....	182
Artigo 3: RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE P16INK4a E DE Ki 67 EM EPITÉLIO CERVICAL UTERINO NORMAL, DISPLÁSICO E NEOPLÁSICO E INFEÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).....	206
Article 3: CORRELATION BETWEEN THE P16INK4a AND Ki67 EXPRESSION IN NORMAL, DYSPLASTIC AND NEOPLASTIC UTERINE CERVICAL EPITHELIUM AND INFECTION BY HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV).....	241
PERSPECTIVAS .....	276
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	281

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Estudos epidemiológicos demonstram que cerca de 99,0% dos carcinomas cervicais estão associados à infecção persistente por alguns tipos de Papilomavírus Humano (HPV). O longo período de latência a partir da infecção primária e o aparecimento de lesões sugerem que fatores adicionais, como início precoce das relações sexuais, número de parceiros, tabagismo, uso de hormônios, presença de co-infecções, estejam envolvidos no processo de carcinogênese. A co-infecção por *Chlamydia trachomatis* (CT) tem sido sugerida, como um fator contribuinte na patologia cervical. A detecção precoce das lesões e o grau histológico são fundamentais, mas às vezes, difícil. O emprego de marcadores prognósticos, através da técnica de imuno-histoquímica possibilita esclarecer e complementar resultados controversos de citologia e de biópsias.

**OBJETIVOS:** Verificar a presença de infecção pelo *Papilomavírus humano*, tipos de alto risco, a presença de co-infecção por CT, associação com as características epidemiológicas, bem como, identificar a expressão imuno-histoquímica de p16<sup>INK4a</sup>, Ki67, receptores de estrogênio e progesterona em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de cérvix uterina.

**MÉTODOS:** Um estudo transversal envolvendo mulheres assintomáticas foi desenvolvido entre fevereiro de 2003 e janeiro de 2006 em uma Unidade de Atenção Primária à Saúde em Porto Alegre – RS, Brasil para verificar a prevalência de infecção pelo HPV, tipos -16, -18, -31 e de CT. Um total de 89 participantes respondeu a um questionário epidemiológico padronizado sobre as características demográficas, hábitos pregressos, história reprodutiva e de comportamento sexual. A pesquisa de DNA-HPV, tipos de alto risco, bem como a presença de DNA-CT foi identificada através da técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). Após exame

coloscópico, foi coletada biópsia para avaliação imuno-histoquímica empregando os marcadores p16<sup>INK4a</sup>, Ki67, receptores hormonais de estrogênio e progesterona.

**RESULTADOS:** A presença de DNA-HPV foi identificada em 83,0% (74/89) das biópsias, sendo que 46,0% (34/74) eram portadoras de HPV de alto risco. O DNA-CT foi presente em 16/86 pacientes testadas (19,0%). Quanto ao exame anatomopatológico (AP), 7,0% eram lesões de alto grau, 59,0% de baixo grau e em 34,0% não foram observadas alterações. A expressão de p16<sup>INK4a</sup> foi observada em 85,3% (29/34) das mulheres positivas para DNA-HPV-AR e esta associação foi estatisticamente significativa ( $p=0,02$ ), sendo que, todas as biópsias, positivas para HPV-16 (16/34), expressaram a proteína ( $p=0,01$ ). Houve uma associação estatisticamente significativa entre a intensidade de expressão, o padrão de expressão de p16<sup>INK4a</sup> e o grau da lesão ( $p=0,001$ ). A associação entre a expressão de p16<sup>INK4a</sup> e DNA-HPV se mostrou estatisticamente significativa entre fumantes ( $p=0,03$ ; OR: 11,25 IC95%:1,11-114,4), entre mulheres com história prévia de DST ( $p=0,01$ ; OR: 6,82 IC95% 1,53-30,3), com sexarca entre 17-19 anos ( $p=0,048$ ; OR: 8,500 IC95% 0,971-74,424) e em mulheres com três ou mais parceiros sexuais ao longo da vida ( $p=0,02$ ; OR: 8,12 IC95%: 1,31-50,2). Todas as mulheres positivas para DNA-CT foram positivas para DNA-HPV. Entre as portadoras de co-infecção, 56,0% expressaram a p16<sup>INK4a</sup> (OR=0,51, IC95%: 0,17-1,57. Para Ki67, todas as lesões de alto grau, 50,0% das lesões de baixo grau e 31,0% das biópsias negativas expressaram o mesmo ( $p=0,004$ ).

Para as pacientes portadoras de DNA-HPV, o Ki67 foi expresso em 100,0%, 31,0% e 32,0% das lesões de alto grau, baixo grau e fragmentos normais, respectivamente, apresentando uma associação estatisticamente significativa ( $p<0,003$ ). Não foi observada associação entre a expressão do receptor de estrogênio e os desfechos estudados. Já, o receptor de progesterona foi expresso em 42,0% (37/89) dos casos estudados e, 26,5% (9/37) eram positivas para os tipos

virais de alto risco ( $p=0,023$ ). A expressão do receptor de progesterona foi maior em não-fumantes ( $p=0,02$ ), entre as mulheres que utilizavam anticoncepcional oral ( $p=0,03$ ) e que tinham um menor grau de escolaridade ( $p=0,04$ ).

**DISCUSSÃO E CONCLUSÕES:** A presença da infecção persistente pelo HPV em lesões cervicais nos diferentes graus histológicos é fato já demonstrado. A atividade transformadora do vírus, especialmente com a expressão de oncoproteínas virais, facilita a de replicação e a diferenciação do epitélio após a sua integração no genoma hospedeiro. Desta forma, a identificação dos tipos virais de alto risco é essencial para se estabelecer e avaliar o prognóstico das lesões e a expressão imuno-histoquímica de p16<sup>INK4a</sup> e Ki67 podem confirmar resultados citológicos suspeitos.

A co-infecção por CT, descrita em diversos estudos epidemiológicos, tem sido relatada como um fator de risco para a infecção por HPV, bem como o desenvolvimento de lesões mais agressivas. Entretanto, em nosso estudo, não foi encontrada associação entre os desfechos e a infecção por CT, exceto para pacientes com menor grau de escolaridade, provavelmente, em virtude do pequeno tamanho da amostra. Observa-se, através desta análise, a contribuição da técnica de imuno-histoquímica e de marcadores de oncogenicidade, como a p16<sup>INK4a</sup> e do Ki67 no diagnóstico das lesões ativas. A associação das variáveis epidemiológicas com estes marcadores se mostrou efetiva, já que existem evidências de que alguns destes podem facilitar e contribuir para o desenvolvimento destas lesões.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Epidemiological studies have shown that about 99.0% of cervical carcinomas are related to persistent infection caused by some human papillomavirus (HPV) types. The large latency period since primary infection and the appearance of lesion suggests that additional factors such as age at first intercourse, number of sexual partners, smoking, oral contraceptive use and other factors are involved in the carcinogenesis process. Among this, the co-infection by *Chlamydia trachomatis* (CT) have been suggested by some authors as a contributor factor in the cervical pathology. The precece detection of lesions and the histological grade are important, but sometimes difficult. The use of prognostic markers through immunohistochemical technic clarify and complement controversial results in cytology.

**OBJECTIVES:** Verifying the presence of *Human papillomavirus* infection, high – risk subtypes, the presence of *CT* co-infection, and the association with the epidemiological factors as well as identifying the immunoistochemical expression of p16<sup>INK4a</sup>, Ki67, and estrogen and progesterone receptors in pre-neoplastic and neoplastic lesions of uterine cervix. .

**MATERIALS AND METHOS:** A cross-sectinal study with assintomatic women was conducted between february 2003 and december 2006 in a primary care unit in Porto Alegre- RS, Brazil to verify the prevalence of Papillomavirus infection, sub-types -16,18,31 and CT infecttion. The participants answered a questionnaire about sociodemographic characteristics, former habits, reproductive history and sexual behaviour. The high-risk DNA-HPV subtypes reserach (HPV - 16,-18,-31) and the presence of DNA-Chlamydia trachomatis (CT) was identified through Polimerase Chain Reation Technique (PCR). After colposcopi examination, was collected biopsy for immunohistochemical analysis of p16<sup>INK4a</sup>, Ki67, estrogen and progesterone receptors..

**RESULTS:** The DNA-HPV was observed in 83% (74/89) biopsies and 46% (34/74) were high-risk types (16,18,31). DNA-CT was detected in 16/86 patients (19%). In relation to anatomopathological exam, 7% were high-squamous intraepithelial lesion (HSIL), 59% low squamous intraepithelial lesion (LSIL) and in 34% no was observed alterations. The expression of p16<sup>INK4a</sup> was observed in 85,3% (29/34) positive women to DNA-HPV HR and this association was statistically significant (p=0,02). All biopsies HPV-16 positive (16/34) expressed p16<sup>INK4a</sup> (p=0,01). There was a significant association between intensity, pattern of expression and grade of lesion (p=0,001). The association between p16<sup>INK4a</sup> expression and DNA-HPV was statistically significant in smokers (p=0,03; OR: 11,25 IC95%:1,11-114,4), in women with previous history of sexual transmitted disease (SDT) (p=0,01; OR: 6,82 IC95% 1,53-30,3), women with the first intercourse between 17-19 years (p=0,048; OR: 8,500 IC95% 0,971-74,424) and in women with three or more lifetime sexual partners (p=0,02; OR 8,12 IC95%:1,31-50,2). Women positive to DNA-CT were positive to DNA-HPV. Between women DNA-HPV positive, the antibody Ki67 was expressed in 100%, 31% and 32% of HSIL, LSIL and normal fragments respectively and this association was statistically significant (p<0,003). No association was observed between the estrogen receptor expression and the outcomes studied. The progesterone receptor was expressed in 42% of cases studied (37/89), and 26,5% (9/37) was positive for high-risk types (p=0,023). The progesterone receptor expression was greater in non-smokers (p=0,02), between women who use oral contraceptives (p=0,03) and that have lower school-grade (p=0,04).

**DISCUSSION AND CONCLUSION:** The presence of HPV persistent infection in cervical lesions in different histological grades is fact already demonstrated. The virus transforming activity is in accordance with its capacity of replication and the differentiation through epithelia

after its integration. The identification of high types of virus is essential to establish and evaluate the prognosis of lesions.

The co-infection with CT described in several epidemiological studies has been related as a risk factor to acquire the HPV infection and to develop more aggressive lesions. However in our study except in relation to lower school grade no association was observed between the outcomes and the co-infection by CT, probably due to the small sample. It observed through this study, the contribution of the immunohistochemical analysis of oncogenic markers such as p16<sup>INK4a</sup> and Ki67 expression in the diagnostic and follow-up of active lesions. The association of epidemiological variables with these markers showed efficient, and evidence exists that some variables can contribute to lesions transformation.

## I. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as mudanças sócio-culturais influenciaram o comportamento humano tendo, como consequência, o aparecimento de uma série de doenças infecto-contagiosas sexualmente transmissíveis e o aumento do número de casos de câncer, particularmente o de colo uterino, constatado através da implantação de programas de rastreamento [1].

O câncer cervical invasivo representa aproximadamente 10,0% de todas as neoplasias que atingem as mulheres, com cerca de 510.000 novos casos e 288.000 mortes por ano, sendo considerada a segunda causa de câncer mais comum no mundo [2-5].

Nos países desenvolvidos a incidência e mortalidade pelo câncer de cérvix uterina têm decrescido drasticamente, devido à efetividade de programas de rastreamento através do exame citopatológico (também conhecido como exame de pré-câncer ou teste de Papanicolaou) [6].

As menores taxas de câncer cervical são observadas na Europa, América do Norte e Japão. O mesmo não ocorre nos países em desenvolvimento, como o Brasil, onde os programas de rastreamento carecem de melhor organização e controle. As maiores incidências mundiais de câncer cervical são verificadas na América Latina, no sul e leste da África, onde excedem 30 casos por 100.000 mulheres por ano [7].

Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2006 foram registrados no Brasil, aproximadamente, 19.260 casos, com um risco de vida estimado de 20 casos a cada 100 mil mulheres. Excluindo os tumores de pele não melanoma, o câncer de colo do útero tornou-se o segundo tipo de câncer mais incidente no nosso país atingindo elevados índices na região Norte (22/100.000), seguidos das regiões Sul (28/100.000), Centro-Oeste (21/100.000) e Nordeste (17/100.000). Na região Sudeste, segundo o INCA, foi considerado o terceiro tipo mais

incidente (20/100.000). Para 2008, a estimativa se mantém de 28,17/100.000 mulheres de câncer do colo do útero na região sul. [8].

A detecção do câncer cervical em seus estágios iniciais pode poupar a vida da paciente, visto que, a sobrevivência ao câncer de colo uterino depende fortemente do estágio em que a doença se encontra no momento do diagnóstico [9].

A principal causa desta neoplasia é a infecção pelo *Papilomavírus humano* (HPV), uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns e que atinge entre 10,0 a 15,0% da população sexualmente ativa [10-14].

A infecção pelo HPV pode causar lesões com vários graus de relevância patológica, em um epitélio vulnerável [15]; entretanto sabe-se hoje, que nem todos os tipos de HPV são carcinogênicos, sendo os tipos 16 e 18, os mais frequentes já identificados, pois são capazes de induzir a imortalização celular com transformação em fenótipo maligno [16, 17]. Sabe-se também, que esta infecção pode estar associada ao desenvolvimento de câncer de ânus, vulva, vagina e de pênis [18].

Outros fatores não virais associados à interação do vírus ao epitélio cervical para provocar a carcinogênese, não estão ainda bem definidos, sendo esse, o motivo pelo qual, vários estudos epidemiológicos abordando mecanismos envolvidos na patogênese vêm sendo realizados [11, 19-22].

A infecção por HPV é comum nas mulheres em idade reprodutiva, fase em que o epitélio colunar apresenta-se mais exposto, os níveis hormonais encontram-se elevados e os dados disponíveis acerca do assunto são controversos; pois apenas uma pequena proporção dessas infecções resulta em anormalidades citológicas que podem evoluir até o câncer [23].

Atualmente, o diagnóstico do câncer de colo uterino vem sendo realizado, através do exame citopatológico, empregando a coloração de Papanicolaou. Este exame possibilita a identificação de alterações morfológicas citoplasmáticas e nucleares e de seus efeitos na morfologia celular patognomônicas desta infecção. Apesar de seu êxito inicial na redução das taxas de morbi-mortalidade, este exame tem limitações, sendo a ocorrência de resultados falso – negativos, a principal causa desta [22, 24, 25].

A falha de diagnóstico através do método citológico, pela baixa sensibilidade em detectar lesões potencialmente ativas e curáveis, enfatiza a necessidade de que seja identificado outro método de detecção, como por exemplo, biomarcadores específicos para células epiteliais cervicais suspeitas, no intuito de auxiliar no rastreamento primário deste tipo de câncer [26].

Recentes avanços na biologia molecular permitiram o desenvolvimento de técnicas imunológicas e de imuno-histoquímica que possibilitam a detecção de antígenos de proliferação celular ou a expressão de proteínas alteradas no ciclo celular de lesões pré-malignas. A identificação de marcadores tumorais séricos, marcadores nucleares e citoplasmáticos nas células, a dosagem de proteínas, a tipificação de linfócitos peri-tumorais, expressão de moléculas de adesão celular, também tem sido descritos. Kijima e cols. (2003) [27] evidenciam a necessidade de se aliar, sempre que possível, ao estudo citológico e histológico, outras técnicas diagnósticas mais sensíveis [28].

Assim, a presente tese busca identificar a expressão de marcadores moleculares, e diagnósticos para o desenvolvimento de lesões intra-epiteliais cervicais em mulheres que normalmente realizam o exame preventivo do câncer de colo uterino, visando conhecer e correlacionar, na população estudada, fatores epidemiológicos determinantes para a sua evolução.

Esta pesquisa está inserida em um estudo epidemiológico de base populacional desenvolvido na zona norte da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Para tanto, foi realizado um estudo transversal desenvolvido no período de fevereiro de 2003 a janeiro de 2006, buscando verificar a prevalência de lesões cervicais pré-neoplásicas e neoplásicas, características clínicas e alternativas ao diagnóstico citológico, empregando exame colposcópico, histopatológico, de biologia molecular (PCR) e imuno-histoquímica para o diagnóstico dessas lesões.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

### 1. PAPILOMAVIRUS HUMANO - HPV

Uma das maiores descobertas recentes foi o reconhecimento de que o câncer cervical é uma consequência da infecção persistente por alguns tipos de HPV [3].

A associação de verrugas genitais, com o vírus e o câncer cervical confirmou-se após o diagnóstico do vírus do HPV através de técnicas de biologia molecular, sendo que este é descrito em mais de 99% das lesões precursoras e dos casos de câncer [4, 16, 18, 29-32].

#### 1.1. GENOMA VIRAL

O vírus do HPV pertence à família *Papillomoviridae* que infecta o epitélio escamoso estratificado da pele e a mucosa das membranas [10].

O genoma viral é constituído por DNA de fita dupla, circular, não envelopado, com 55 nm de diâmetro. Apresenta, cerca de 7.900 pares de base contendo três regiões. Os genes da região precoce (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) estão envolvidos na transcrição do gene e na replicação viral. Os genes da região tardia (L1 e L2) codificam as proteínas do capsídeo viral [33] (Figura 1). A região controladora, *Long Control Region (LCR)*, que compreende cerca de 10,0% do genoma, contém elementos do controle que interagem com proteínas celulares [34] e elementos responsivos a hormônios glicocorticóides e progesterona que, no conjunto, determinam a modulação positiva ou negativa da transcrição do genoma viral [35, 36].

**Figura 1:** Organização genômica do HPV-16

**Fonte:** [www-micro.msb.le.ac.uk/3035/Papillomaviruses.html](http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/Papillomaviruses.html)

As proteínas virais de alguns tipos de HPV de alto risco coordenam direta ou indiretamente o ciclo de vida dos vírus de acordo com as células que infectam e, a expressão gênica espacial e temporal pode ser observada na figura 2.

A proteína viral E1 mantém na forma episossomal na célula infectada e, uma helicase abre a fita dupla do DNA para permitir a replicação.

A proteína E2 se liga à E1 e também a uma sequência específica do DNA viral. A proteína E2 é um fator de transcrição que regula a expressão dos genes virais e diminui a expressão de E6 e E7 [37].

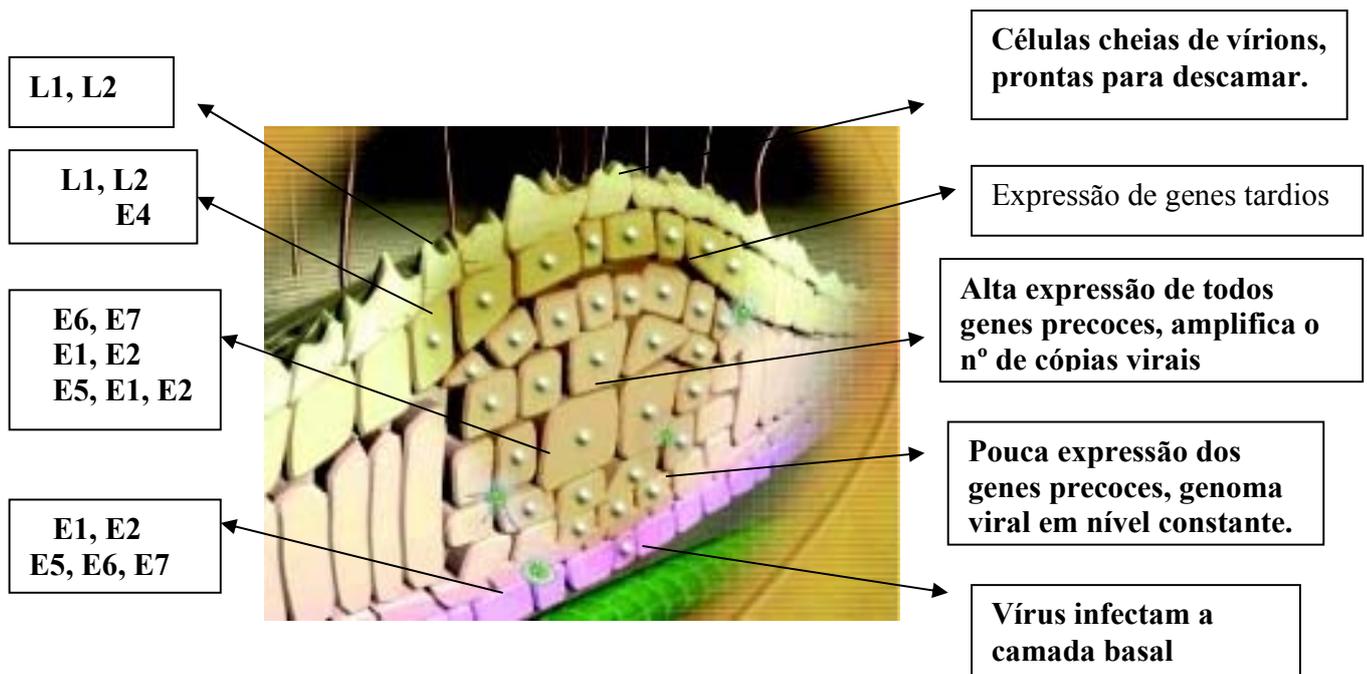
A perda do gene E2 no processo de integração ao genoma da célula hospedeira, tanto favorece a instabilidade dos oncogenes E6 e E7, como também, afeta o mecanismo de morte celular programada, sendo que ambos os eventos colaboram para o aumento da replicação viral e da proliferação celular. Além de participar da replicação do DNA e da regulação da expressão viral, a proteína E2 também está envolvida no mecanismo de apoptose de diferentes linhagens celulares. E2 e E7 podem interagir fisicamente com a proteína p53 e induzir o mecanismo de apoptose p53-dependente, sendo que este processo pode ser bloqueado pela proteína E6 através da inativação de p53 [38].

A proteína E4, interage com proteínas do citoesqueleto (coilócito), permitindo a penetração do vírus [39].

O papel da proteína E5, pequena proteína hidrofóbica que se liga à membrana das células, ainda é pouco entendido, mas sabe-se que esta proteína é expressa em infecções produtivas e pode participar na expansão precoce de um clone de células infectadas. Parece estar envolvida na estimulação e proliferação celulares, já que atua sinérgicamente com o fator de crescimento epitelial (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PGF), fator 1 estimulatório de colônias (FSC-1). Nas células que expressam E5, o *turnover* e a fosforilação dos receptores EGF estão aumentados [31, 40] e, recentemente, foi demonstrado o papel de E5 na prevenção da apoptose, após dano no DNA [31].

Já, as proteínas E6 e E7 do vírus, são expressas também, em tumores malignos anogenitais e, são capazes de imortalizar uma grande variedade de tipos celulares humanos [31].

Os níveis de expressão de E6 e E7 se elevam causando a imortalização celular, após a desestabilização de E2, como resultado da integração do genoma viral em lesões intraepiteliais cervicais [40].



**Figura 2:** Expressão Gênica Espacial e Temporal do HPV de Alto Risco

**Fonte:** De Pereira ESG e cols. Entendendo Melhor a infecção pelo Papilomavirus humano. Shering (2003)

Os genes E6 e E7, expressos nas células neoplásicas HPV-positivas, envolvem a perda da função da rota celular na fase G1, p16 – CDK/ciclina D1-pRB (rota Rb) e p14-MDM2-p53 (rota p53) [41]. Assim, a principal função da proteína E6 é a degradação proteolítica e a inativação da proteína p53, a qual inibe a expressão de proteínas supressoras do crescimento, bem como, o ciclo celular na presença de danos ao DNA.

A proteína E7 é capaz de formar complexos com diversas proteínas da célula hospedeira, principalmente pRb, causando a degradação das mesmas. Estas inativações podem gerar um acúmulo de mutações e, eventualmente, progredir culminando em malignidade [34, 42].

Resumindo, a possibilidade das lesões causadas pelos HPVs de baixo grau avançar para estágios mais graves ou câncer invasor, está ligada à instabilidade genética, o que se reflete pelas aberrações cromossômicas e pela expressão de dois oncogenes, E6 e E7, que em células normais infectadas pelo HPV de alto grau, está suprimida pelo mecanismo de controle da proliferação

celular. O ciclo de replicação do HPV é regulado pela proteína E2, que se liga a uma seqüência específica do DNA, podendo atuar como ativadora da transcrição ou supressora da expressão, dependendo do contexto. Assim, a perda da função de E2, pode ser o primeiro passo para transformação celular neoplásica [43, 44].

## **1.2. PATOGÊNESE**

O HPV pode causar lesões de vários graus de relevância patológica em um epitélio vulnerável [15]. O comportamento biológico das lesões induzidas pelo vírus depende do tipo de HPV. Os tipos virais 16, 18 e 31, considerados de alto risco oncogênico, estão associados a lesões de alto grau (HSIL) e carcinoma invasor. Os tipos 6 e 11, causam normalmente lesões condilomatosas e estão associados às lesões de baixo grau (LSIL), com tendência à regressão [33, 40].

Uma vez que o vírus penetrou na célula hospedeira, os genes precoces de todos os tipos de HPV são ativados, são expressos no núcleo, controlam a transcrição e a transformação celulares [45], pois o genoma viral não codifica nenhuma DNA polimerase ou enzima necessária para a sua replicação dependendo, exclusivamente, da célula hospedeira para gerar sua progênie.

Nas lesões malignas associadas aos HPV 16 e 18 são observadas várias alterações moleculares, sendo que, o DNA viral permanece integrado ao genoma da célula hospedeira, ocorre perda da função das proteínas E1 e E2, e aumento na expressão de E6 e E7, provocando uma instabilidade celular [3]. Após, ocorre a transcrição da fusão do vírus com a célula, e o RNAm das proteínas E6/E7 adquirem estabilidade, aumentando a quantidade de oncogenes virais intracelulares [44]. Desta forma, as proteínas E6 e E7 desregulam o ciclo celular, manifestando-

se pela expressão anormal de várias proteínas associadas ao ciclo como Ki67, ciclina E e p16<sup>INK4A</sup>, entre outras [46].

Clinicamente, o vírus do HPV infecta o epitélio escamoso estratificado, metaplásico e colunar do colo uterino, atingindo, inicialmente, a porção inferior do epitélio ou a camada basal, onde penetra. Assim, a transcrição viral está associada ao estado de desdiferenciação das células epiteliais infectadas (Figura 3).

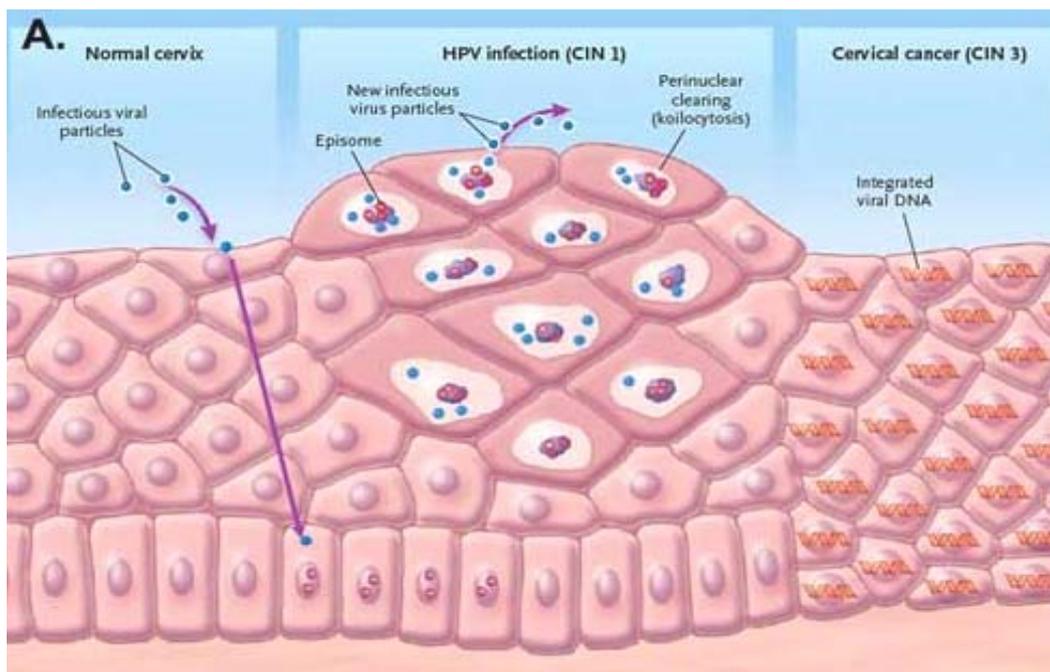


Figura 3: Penetração na célula normal, infecção e integração viral no epitélio cervical

Fonte: [http://www.casestudies.med.utah.edu/med1/cervical/print\\_part\\_case.php?part=biochemistry](http://www.casestudies.med.utah.edu/med1/cervical/print_part_case.php?part=biochemistry)

Nas células indiferenciadas em divisão, presentes na camada basal do epitélio, a infecção pelo vírus acarreta uma baixa taxa de transcrição dos genes da região precoce e baixa taxa de

replicação do DNA viral, que permanecem na forma epissomal. Aí, ocorre a estabilização pela replicação sincrônica, com divisão basal e subsequente expressão morfológica dos genes precoces e tardios, durante a diferenciação celular [45]. Quando a célula infectada se divide, o DNA viral é transmitido para cada célula-filha. As proteínas responsáveis pela replicação do DNA só são expressas durante a fase de síntese (S) do ciclo celular, não sendo expressas nas células maduras [47].

À medida que as células amadurecem e migram em direção à superfície da pele, o epissoma viral é encontrado nas camadas superficiais do epitélio. Neste local, os genes virais são expressos e inicia a replicação do DNA viral. As proteínas tardias do capsídeo (L1 e L2) são sintetizadas apenas nas camadas diferenciadas do epitélio [47]. O genoma viral codifica uma série de proteínas que induzem a permanência de replicação do DNA ativada nas células diferenciadas, podendo então, ser utilizada para a replicação do vírus [34]. A extensão da colonização viral do epitélio anogenital pode se tornar clinicamente aparente entre um mês e meio até oito meses após a infecção, dependendo de fatores adicionais que possam facilitar o processo [45].

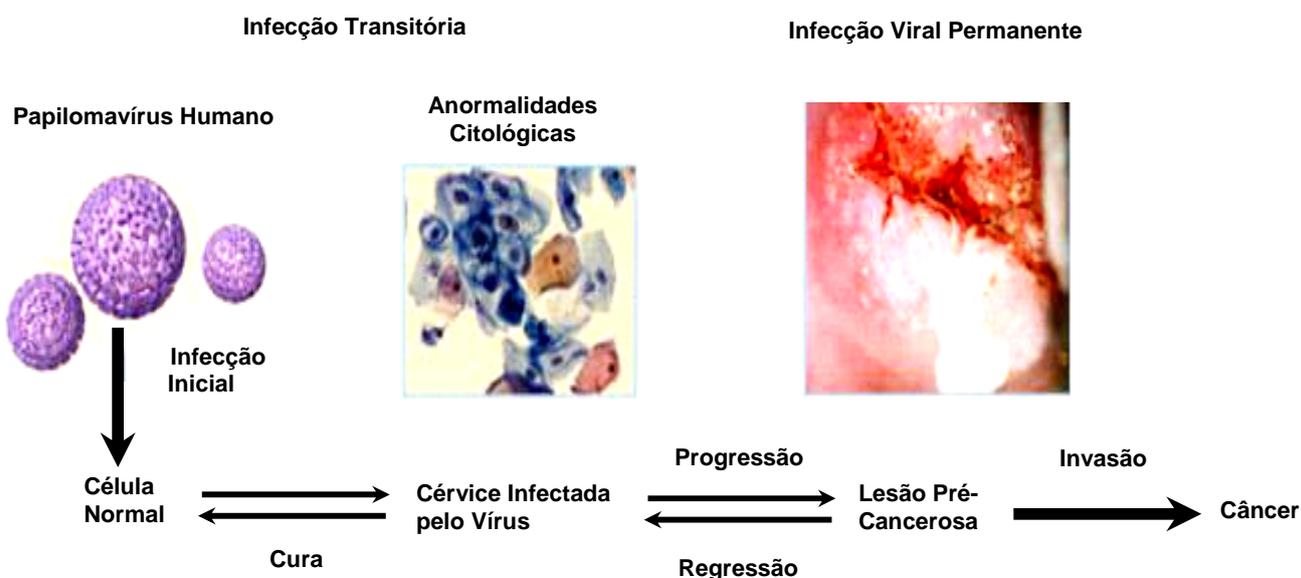
As formas de infecção pelo HPV são atualmente classificadas em três categorias: clínica, subclínica e latente. A primeira é evidenciável a olho nu (condiloma acuminado, plano) e representa 2-3,0 % dos casos. A segunda é diagnosticada pela colposcopia ou microscopia (citologia ou histologia) e representa 60,0% dos casos de HPV anogenital e 95,0% do HPV cervical. A forma latente é diagnosticada por meio de técnicas moleculares e de hibridização “in situ” do DNA viral em indivíduos com clínica e citologia/histologia normais [48].

Um possível mecanismo envolvido na oncogênese do HPV 16, mediado pela oncoproteína E7, é decorrente da instabilidade genômica que precede anormalidades no

centrossomo. Este efeito está relacionado à desagregação dos cromossomos que precede anormalidades, nuclear e genômica. A expressão da oncoproteína E6 de HPV-16 está associada com marcada atipia nuclear e concomitante acúmulo de centrossomos [49].

O carcinoma cervical invasivo é precedido pela neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Como definido segundo a nomenclatura da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization -WHO*) para classificação de tumores da cérvix uterina, a classificação NIC é subdividida em três graus de displasia ou de alterações intraepiteliais (1, 2 e 3). O crescimento dos graus das lesões de NIC corresponde ao aumento do risco de progressão para lesão de alto grau e câncer invasor [50].

As lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL), também conhecidas como displasias leves, NIC 1, na maioria dos casos, representam processos que terão regressão espontânea sem terapêutica. Algumas mulheres com este diagnóstico, porém, poderão desenvolver lesões de alto risco para o câncer (HSIL) [48] (Figura 4).



**Figura 4:** Evolução da infecção: de transitória a permanente

**Fonte:** Wright TC Jr & Schiffman M (2003) ver ref

As alterações celulares causadas pelo vírus de baixo grau exibem um halo perinuclear proeminente e núcleo atípico; esta modificação nas células cervicais é denominada de atipia coilocítica, uma alteração observada tanto em esfregaços citológicos como em biópsias teciduais que apresenta o efeito citopático induzido pelo HPV.

Em virtude das células coilocíticas em condilomas acuminados conterem partículas virais compatíveis com a infecção pelo HPV e exibirem cavitação perinuclear citoplasmática, atipia nuclear e anisocitose, esta alteração é considerada patognomônica da infecção viral que, em geral, é benigna [51-53]. Em estudo desenvolvido por Kruse e cols. [50], os casos de NIC 1 com coilocitose não progrediram, ao contrário dos 27,0% dos casos que evoluíram e que não apresentavam a atipia coilocítica característica.

### **1.3. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS**

Vários estudos têm sido realizados em diversos países com o objetivo de identificar a presença do DNA do HPV em mulheres submetidas a programas de rastreamento cervical, bem como, identificar co-fatores que possam estar relacionados à persistência do vírus ou à progressão das lesões [19, 28, 54-59].

Hildesheim e cols. [60] observaram em estudo realizado em 343 mulheres, 84,0% de positividade para o HPV; sendo que destas, 41,0% apresentavam infecção persistente. Normalmente, a infecção pelo vírus é transitória, sendo que o câncer cervical surge entre as mulheres com DNA-HPV persistente, em especial naquelas com mais de 30 anos.

Em 1998, outros autores compararam duas áreas geográficas diferentes e os possíveis fatores de risco associados ao desenvolvimento do câncer cervical. A Alemanha apresentava 45,8 casos em 100.000 mulheres entre 1984 e 1988 e a Dinamarca, 16,4 casos em 100.000 mulheres em 1988 e observaram que, nas alemãs, o HPV foi encontrado 2,5 vezes mais freqüente em mulheres com idade entre 20-24 anos do que naquelas com idade entre 30-39 anos; já, nas dinamarquesas, o vírus foi encontrado três vezes mais nas mulheres mais jovens. Outro achado relatado foi um índice de positividade maior nas mulheres que tiveram a primeira relação sexual há pouco tempo, do que naquelas sexualmente ativas há mais tempo. Isto se deu, provavelmente, pelo fato destas mulheres terem adquirido mecanismos imunológicos de defesa ou de redução no risco de re-infecção [28].

Em Honduras, Ferrera e cols. [19], recrutaram 99 mulheres de hospitais públicos, portadoras de câncer de células escamosas entre os anos de 1993 e 1995. Observaram, através de entrevistas realizadas, uma forte associação entre a presença do DNA do HPV e o câncer cervical, assim como, com o grau de instrução, a idade do primeiro intercuro sexual e a exposição à fumaça de fogão à lenha por tempo maior.

Em um estudo longitudinal entre os anos de 1991 e 1995, realizado por Hangsee e cols. [61] foi observada uma elevada prevalência do vírus (43,0%) entre as mulheres em 02 anos de pesquisa. Verificaram, também, uma persistência de infecções por HPV até oito meses nas pacientes analisadas.

Pouco se sabe sobre a freqüência ou a persistência da infecção, já que a maior parte dos estudos têm por base uma única medida da presença do vírus na amostra, garantindo dados de prevalência, porém não permitindo inferir dados de permanência viral ao longo do tempo. Em estudo que investigou a persistência da infecção entre 621 universitárias de Montreal por dois

anos, com intervalo de seis meses, foi estimada a probabilidade de adquirir ou de curar a infecção, considerando os tipos de HPV, oncogênico ou não. A razão de incidência foi de 14 casos/1000 mulheres-mês, com intervalo de confiança (IC95%: 11,4-16,3) e 12,4 casos/1000 mulheres-mês (IC95%: 10,4-14,8) para adquirir HPV de alto ou baixo risco, respectivamente. HPV-16 foi o que apresentou maior persistência. Os resultados da publicação indicam que a infecção é transitória, possivelmente devido à supressão viral pelo hospedeiro [62, 63].

Em outro estudo de coorte, Sellors e cols [64] recrutaram 500 mulheres HPV negativas e 121 mulheres HPV positivas, que foram novamente testadas, 1 ano após o início do estudo, (média 14 meses  $\pm$  2). Destas, 253 (50,6%) previamente negativas para o vírus e 54 (44,6%) que eram positivas foram re-testadas. A incidência de infecção ocorreu em 11,1% (28/253) das mulheres, com taxa mais elevada, 25,0% (6/24), no grupo pertencente à faixa etária de 15-19 anos.

No Brasil, estudos epidemiológicos vêm sendo realizados, identificando a prevalência da infecção viral, bem como os tipos mais comumente detectados.

Em estudo desenvolvido com 228 mulheres em Belém (Pará) no período de 1992 a 1996 [65], foi verificado uma prevalência de infecção pelo HPV em 70,3% de pacientes com carcinoma invasor ou adenocarcinoma (grupo A), 63,0% de mulheres portadoras de NIC II ou III (grupo B) e 36,8% das pacientes com cervicite crônica (grupo C). O HPV 16 foi registrado em 60,4% das amostras positivas do grupo A e 54,5% do grupo B, sendo que os tipos 16,18 e 33 representaram 71,4% dos detectados no grupo C.

Em pesquisa de revisão realizada entre os anos de 1993 e 1998, a infecção pelo HPV foi mais frequente em adolescentes que fazem uso de contraceptivo oral. Estes autores não observaram associação entre gestação e o hábito de fumar com a infecção pelo vírus HPV [66].

Estudo realizado em Recife, no ano de 2000, detectou um aumento em 50 vezes de desenvolver câncer invasor nas pacientes portadoras de infecção por HPV de alto risco. Os autores acreditam que este fato pode se dever à falta de acompanhamento do diagnóstico, sendo na maioria das vezes observados quando em estágio já avançados. Outro aspecto abordado foi a relação custo-benefício observada na eficácia do diagnóstico molecular em protocolos de rastreamento, em detrimento da citologia que, muitas vezes, não identifica pacientes em risco de desenvolver o câncer de colo uterino. [67].

Em 2001, um estudo realizado em Porto Alegre-RS, verificou a prevalência e aspectos epidemiológicos relacionados ao diagnóstico citológico de ASC-US (atipias inflamatórias de significado indeterminado) em população de 977 mulheres de baixo risco para câncer cervical no Rio Grande do Sul. Mais de 6,0% das mulheres apresentaram ASC-US, 2,1% apresentaram lesão escamosa de baixo grau e 0,6% lesão de alto grau. As pacientes com diagnóstico de ASC-US apresentaram presença de DNA-HPV mais freqüentemente do que aquelas com citologia normal [68].

Nonnenmacher e cols. [69], em estudo transversal que arrolou 975 mulheres observaram uma prevalência de 27% da infecção viral, combinando o método da reação em cadeia da polimerase (PCR) e de captura híbrida II (CH II). Já, quando analisadas separadamente, as prevalências de infecção por HPV foram de 15% e 16% para CH II e PCR, respectivamente. Neste estudo, fatores epidemiológicos foram sugeridos como contribuintes para a infecção, especialmente aqueles relacionados ao comportamento sexual (idade precoce do 1º intercurso, elevado número de parceiros, e estado marital). O grau de escolaridade também se mostrou associado à infecção genital pelo HPV neste estudo.

Em estudo de coorte conduzido em 4284 mulheres, Longatto Filho e cols. (2006) [70], empregando a citologia aliada ao teste de CH II, detectaram uma prevalência de HPV de 17,1%. Esta prevalência variou de 33,9% em mulheres abaixo de 20 anos a 11,0% naquelas acima de 41 anos. O HPV foi mais prevalente nas fumantes (OR=1,31; IC95%: 1,1-1,6), em mulheres, com dois ou mais parceiros sexuais na vida (OR=1,9; IC95%: 1,6-2,4) e naquelas que possuíram dois ou mais parceiros sexuais nos 12 meses que antecederam a pesquisa (OR=1,6; IC95%: 1,2-2,2). A detecção do HPV aumentou paralelamente com as anormalidades citológicas, sendo maiores nas lesões escamosas de alto grau ( $p=0,001$ ).

#### **1.4. CO-FATORES ENVOLVIDOS NA INFECÇÃO VIRAL**

O HPV é o principal fator causal do carcinoma escamoso, entretanto, fatores adicionais são necessários e influenciam direta ou indiretamente a instalação de mecanismos promotores das lesões [71].

Verifica-se que, apesar de 99,7% das neoplasias invasoras do colo uterino apresentar DNA-HPV, apenas 1% das mulheres, apresenta risco para o desenvolvimento de câncer invasor [72]. Este fato está relacionado, provavelmente, a outros fatores que contribuem sinergicamente para o progresso das lesões precursoras, entre eles as co-infecções.

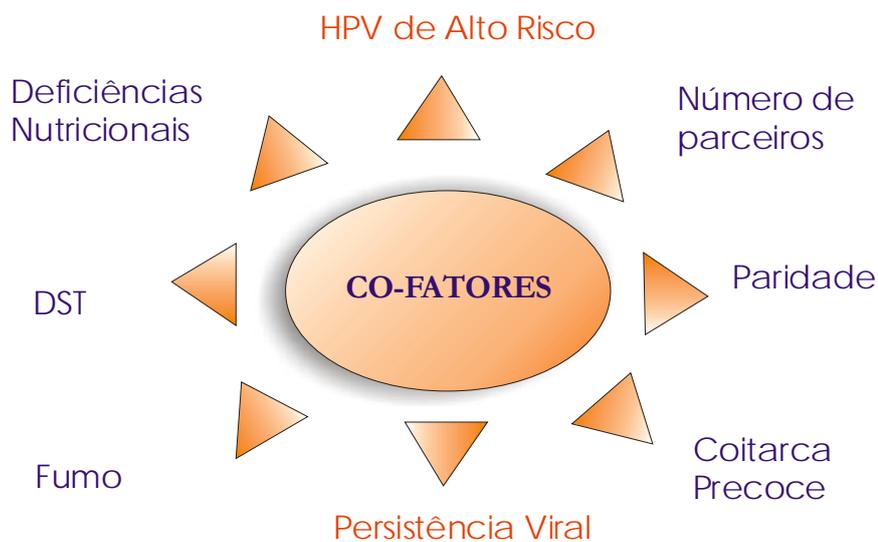
Lesões precursoras induzidas pelo HPV se desenvolvem aproximadamente uma década após a infecção inicial, permitindo seu reconhecimento e tratamento após a lesão inicial [72].

O número de parceiros, a paridade, coitarca precoce, a presença de doença sexualmente transmissível, tabagismo e deficiências nutricionais, podem contribuir para a persistência das lesões ou o agravamento das mesmas (Figura 5). Além disso, outros estudos demonstram ainda

que mulheres de pacientes com câncer de pênis têm risco aumentado de desenvolver o carcinoma cervical mais tarde [43, 73].

Inúmeros trabalhos [20, 71, 74-77] têm buscado verificar e confirmar estas afirmações.

## Principais Co-fatores na Carcinogênese



**Figura 5:** Co-fatores envolvidos na carcinogênese do colo uterino

**Fonte:** De Pereyra & Parellada. Entendendo Melhor a infecção pelo Papilomavirus humano. Shering (2003)

### 1.4.1. O SISTEMA IMUNOLÓGICO e ASSOCIAÇÃO COM OUTROS AGENTES ETIOLÓGICOS

As infecções pelo HPV possuem afinidade a certos sítios da mucosa, exceto em pacientes imunocomprometidos, o que sugere que mecanismos imunológicos locais são importantes no controle destas infecções, geralmente prolongadas [78].

A resposta celular e humoral desempenha importante papel na infecção pelo HPV. Em situações como, transplantes, gravidez, uso de quimioterápicos e, em certas infecções

oportunistas, como em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), ocorre uma maior suscetibilidade e uma elevada prevalência de verrugas genitais. Este aspecto reforça a importância da imunidade mediada por células, através dos linfócitos CD4+ (auxiliares) e CD8+ (citotóxicos). Condilomas em regressão espontânea apresentam um infiltrado celular composto por linfócitos T e macrófagos [79, 80].

Linfócitos T citotóxicos, específicos para regiões antigênicas E6 e E7 dos HPV 16 e 18, foram detectados no sangue periférico de pacientes com lesões intra-epiteliais de alto grau [81].

Durante a resposta celular, em torno de 20-30,0% das pacientes, principalmente, adolescentes que apresentam o condiloma anogenital externo, regridem o quadro de infecção. O tratamento causa remissão em 80,0% dos casos; já, nos 20,0% restantes, uma terapia imunomoduladora adjuvante se faz necessária.

Utilizando um modelo animal, foi observada uma resposta humoral contra proteínas do capsídeo viral e, neutralização dos vírions durante a infecção. Anticorpos contra proteínas precoces do vírus, E6 e E7 dos tipos 16 e 18 ocorrem com mais frequência e, títulos maiores em pacientes com câncer de colo uterino são observados. Mas a detecção dos anticorpos IgA e IgG (imunoglobulinas A e G) específicas para L1 do HPV16 não se relaciona com a eliminação do vírus e indicam, normalmente, infecções persistentes [82].

A produção de IL-2 (interleucina-2) dependente de células T-helper (células auxiliares) e a resposta humoral através da produção de IgG foi determinada em estudo conduzido por De Gruijl e cols. (1999) [83], frente a infecção pelo vírus do HPV-16 e o desenvolvimento da patologia cervical. A resposta através da produção de IgG foi associada com a persistência de infecção pelo HPV 16 e lesões de alto grau; enquanto que a maior frequência de resposta Th foi

observada em pacientes com a persistência viral, como também entre aquelas que já o haviam eliminado, independentemente do grau da lesão.

Os autores relatam que estudos indicam que a citocina IL-10 inibe a imunidade celular, predispondo a uma resposta tipo 2 ao invés da resposta tipo 1, o que favorece a progressão das lesões HPV induzidas [84-86]. O Fator de Necrose Tumoral- alfa (TNF-  $\alpha$ ) e a IL-10 exercem ações antagônicas; enquanto a primeira parece diminuir, a segunda citocina se encontra elevada no câncer cervical [87].

Estes fatores imunológicos interferem no aparecimento de co-infecções e o impacto das doenças sexualmente transmissíveis no desenvolvimento da neoplasia intraepitelial cervical tem sido reconhecido nos últimos vinte anos; sendo que, quando a paciente encontra-se imunologicamente comprometida, seja por infecções superpostas ou não, este quadro pode ser mais grave.

Outros agentes etiológicos têm sido investigados, com forte suspeita de associação com o câncer cervical como *Chlamydia trachomatis*, *Gardnerella vaginalis* e *Trichomonas vaginalis*; entretanto *Neisseria gonorrhoeae* e o vírus do *Herpes simplex* já foram desconsiderados como possíveis agentes etiológicos [66, 74, 88].

A associação entre a presença de *Chlamydia trachomatis* e o carcinoma de cérvix já foi citada por alguns autores [89-91]. Esta causaria uma severa inflamação na cérvix associada com atipia metaplásica na zona de transformação, sendo sua prevalência maior nas mulheres com citologia anormal do que naquelas em que a citologia não está alterada. Este fato pode ser explicado pela inibição de apoptose (morte celular programada) causada por um bloqueio na liberação da citocromo C mitocondrial e caspase 3, as quais permitem que a célula infectada escape da célula T- CD8+ [88]. Estes autores sugerem, também, que a infecção por *Chlamydia*

*trachomatis* impede a função da célula NK – natural killer na produção de interferon gama, bloqueando o sinal na indução da resposta MHC (complexo maior de histocompatibilidade) classe II e ativação da resposta celular Th1, permitindo o escape de defesa do sistema imune.

Muñoz e cols. (2002) [59], constataram uma associação positiva entre a presença de anticorpos IgG contra citomegalovírus e a progressão das lesões de baixo grau nas pacientes HPV positivas.

Quanto ao Herpes-virus tipo 2 (HSV-2), ainda permanece obscuro o motivo pelo qual o mesmo elevaria o risco do câncer. Uma hipótese sugerida tem sido a de que as úlceras herpéticas genitais, causadas pelo HSV-2, poderiam ajudar o HPV a penetrar furtivamente na camada do tecido do colo uterino, onde o câncer se origina. Outro aspecto considera que, o HSV-2 poderia gerar danos ao DNA devido às lesões inflamatórias e, com isto, levaria ao surgimento de células cancerosas cervicais [76].

Sabe-se, no entanto, que essas co-infecções isoladamente não induzem o aparecimento de lesões pré-neoplásicas, podendo ser inferido que sejam apenas agentes agravantes no desenvolvimento do câncer cervical.

#### **1.4.2. FUMO**

Estima-se que entre 25,0 e 30,0% de todos os tipos de câncer em países desenvolvidos como Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Escandinávia, Cingapura e Austrália estejam relacionados ao uso do tabaco. Esforços planejados por órgãos responsáveis pela saúde pública têm sido feitos na tentativa de diminuir estes índices, o que já pode ser observado entre os homens, principalmente [75].

Além da infecção pelo HPV, o tabagismo tem sido implicado como co-fator do câncer cervical. Embora o hábito de fumar tenha sido identificado como um co-fator, não está claro se exerce um efeito precoce ou tardio na evolução das lesões [75, 92].

Vários estudos apontam para o efeito negativo do hábito de fumar nesta patologia. Há evidências de que o muco cervical de fumantes seja mais suscetível a mutações do que o muco cervical de não-fumantes e que, as mulheres fumantes tem uma quantidade de células de Langerhans reduzida no epitélio cervical, sugerindo uma diminuição do efeito imunológico neste local. Este dado é apoiado por estudos clínicos que revelam a associação do hábito de fumar e história de condições imunossupressoras em pacientes jovens com doença cervical invasiva [71, 93-96].

Em 2001, Wyatt e cols. [97], baseados em dados do Center of Disease Control (CDC) dos Estados Unidos e de sistemas que integram a sobrevivência a fatores de risco, comportamento e prevenção, relataram que, em dados coletados, 30,0% dos adultos em Kentucky são fumantes e, 42,0% dos adolescentes fumam normalmente. Estes autores comentam, também, que durante os anos de 1997 e 1998, 61,0% dos casos de câncer cervical invasor eram de mulheres fumantes. Exposição, idade de início, período e frequência de consumo de cigarros, todos estes fatores parecem influenciar na incidência de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e câncer cervical [71, 95, 98].

Segundo estudo realizado por Nunez e cols. (2002) [95], envolvendo trabalhadoras do sexo e fumantes, na Venezuela, o risco de desenvolvimento de lesões cervicais pré-invasivas e invasivas foi maior em mulheres que fumaram mais de vinte cigarros por dia durante mais de cinco anos. Em 1998, Ho e cols. (1998) [98], observaram que o risco de desenvolver NIC 3 aumentou entre as mulheres fumantes; sendo que, não foram encontradas diferenças

estatisticamente significativas entre as mulheres que fumaram vinte cigarros ou mais e aquelas que fumaram menos de vinte cigarros por dia; embora a importância do tempo de exposição ao fumo tenha sido a mesma constatada por Nunez e cols. (2002) [95].

Em um estudo realizado por Lacey e cols. (2000) [99], foi verificada uma forte associação entre o hábito de fumar e o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas. Entretanto, não foi constatada associação entre o tabagismo e adenocarcinoma cervical. Este fato sugere que, embora os tipos histológicos dos dois tumores sejam causados pelo HPV e tenham origem na cérvix, a patogênese das lesões pode ser diferente.

Os dois mecanismos principais pelo qual o hábito de fumar contribui para a oncogênese cervical incluem, a exposição direta do DNA de células epiteliais cervicais à nicotina e a cotidina; e a produtos metabólicos esperados a partir de reações com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e aminas aromáticas, componentes da fumaça do cigarro.

As associações entre diferentes genótipos de enzimas carcinogênicas-metabolizantes, fumo e neoplasia cervical, foram alvos de alguns estudos, pelos quais se pode concluir que certas nitrosaminas específicas do tabaco são substâncias para a enzima detoxificante citocromo P450 fase I (CYP2D6), e por esta razão, podem estar envolvidas na patogênese da neoplasia intra-epitelial cervical [71].

Em 2004, autores desenvolveram estudo propondo uma relação entre uma exposição ativa ao tabaco e aberrante metilação do gene promotor p16 em câncer de células escamosas cervicais e displasia cervical. Concluíram que, a metilação aberrante do gene p16 está associada fortemente com o uso do tabaco em pacientes portadoras de câncer cervical e de lesões potencialmente ativas [100].

A imunossupressão, como citado anteriormente é outro mecanismo que pode explicar a carcinogênese relacionada ao tabagismo, já que o epitélio torna-se mais vulnerável à penetração viral [101]. Alterações verificadas no sistema imune periférico das pacientes fumantes, incluem a elevação do número de células sanguíneas, o aumento do número de linfócitos T citotóxicos/imunossupressores, a diminuição do número de linfócitos T indutores/auxiliares, discreta supressão da atividade de linfócitos T, significativo decréscimo da atividade de linfócitos *natural killers (NK)* e baixos níveis sanguíneos de imunoglobulinas, exceto pela IgE, que é elevada [71].

A possibilidade de progressão das lesões desde NIC1 a NIC 3, bem como, a falha de sucesso nos protocolos de tratamento, já havia sido detectada. Em estudo prévio, Frega e cols. (2003) [77], demonstraram que as pacientes fumantes tinham três vezes mais chances de falhas na resposta ao tratamento do que as não-fumantes.

Em pesquisa desenvolvida por Harris e cols. (2004) [92], foi verificada a associação entre o hábito de fumar e a presença de antígeno de proliferação celular, o Ki67 e HPV oncogênico. Verificaram que o hábito de fumar, e a presença de produtos derivados do cigarro estão associados com a evolução das lesões de NIC1 a NIC2 ou NIC3.

### **1.4.3. HORMÔNIOS ESTERÓIDES**

Os hormônios esteróides influenciam a suscetibilidade e a predisposição a muitas infecções genitais. Estes efeitos são variáveis, podendo modificar a severidade dos sintomas, o risco de re-infecção, a persistência ou a probabilidade da doença progredir, dependendo do agente patogênico envolvido [87, 102].

A incidência de infecções pelo HPV é variável na evolução biológica da mulher. Rara na infância, freqüente durante o período reprodutivo e variável na menopausa, sendo controversa a freqüência nesta fase [103], o qual parece se justificar por uma queda da imunidade nesta faixa etária [104].

Diferente de outras neoplasias malignas ginecológicas de alta prevalência, o câncer cervical não tem sido considerado como hormônio-dependente. A ação biológica dos esteróides resulta na transcrição de genes-alvo [105], desencadeada pela ligação do hormônio a receptores específicos presentes.

Entretanto, estudos já conduzidos anteriormente como o de Chan e cols em 1989 [35], identificaram seqüências presentes na LCR dos HPV -11 e -18 que funcionam como elementos responsivos a glicocorticóides e progesterona, sugerindo uma possível participação destes na regulação da expressão dos oncogenes virais. Dois destes elementos são estimulados pela ação de progesterona e suspeita-se da existência de um terceiro receptor que é estimulado pelo estrógeno [102].

Estudos epidemiológicos relacionando o uso de anticoncepcionais orais e a presença de lesões intra-epiteliais e o desenvolvimento de câncer vêm sendo desenvolvidos [76, 106-112].

Hildesheim e cols. (1990) [106] observaram, um aumento significativo do risco relativo (RR) em mulheres infectadas pelo HPV e usuárias de anticoncepcionais orais (ACO).

Em outro estudo conduzido por Herrero R e cols. (1990) [107], avaliaram pacientes usuárias de anticoncepcionais injetáveis (ACI) e não observaram aumento de risco relativo para as que utilizaram por menos de cinco anos, mas sim para as usuárias de ACI por mais de cinco anos (RR=2,4; IC95%: 1,0-5,7). Este aumento foi maior para as usuárias de ACI por mais de 10

anos (RR=3,4, IC95%: 1,1-24,9). Já, para aquelas mulheres tratadas com ACI por muitos anos (mais de 10 anos), o RR foi particularmente elevado entre aquelas que nunca tinham sido examinadas pelo exame de Papanicolaou ou que realizaram o exame há mais de dois anos (RR=6,3; IC 95%: 2,1-18,7).

Monsonogo e cols. (1991) [113], verificaram a presença de elevados níveis de receptores de progesterona em lesões de alto grau (NIC II/III) relacionadas à infecção pelos HPV 16 e 18, assim como, Kedzia e cols. (2000) [114].

A possibilidade dos hormônios esteróides atuarem diretamente sobre o genoma do HPV é ainda controversa. Segundo Pater e cols, 1990 existem no genoma do vírus, locais específicos nos quais os hormônios atuariam induzindo maior replicação viral e, em consequência, maior produção de proteínas transformadoras [2, 115]. Contudo, a presença de hormônios esteróides não seria indispensável para a replicação viral, apesar de células com estes receptores poderem apresentar algumas atipias. Este fato, se verdadeiro, é preocupante, visto a freqüente utilização da terapêutica hormonal, tanto na forma de anticoncepcionais orais, como na reposição durante o climatério [106, 108].

Os hormônios esteróides podem favorecer a infecção persistente pelo HPV de várias formas: aumentando a expressão e a atividade de transformação dos oncogenes virais E6 e E7, inibindo a resposta imunológica e a expressão de MHC I e II, além de interferirem na regressão das lesões causadas pelo vírus [116]. Desde que a estrutura dos oncogenes virais E6 e E7 foi descoberta e associada com o potencial oncogênico do HPV-16, o efeito do estrogênio na transcrição destes oncogenes, através de mecanismo sinérgico pode ter uma importância biológica na transformação maligna das células infectadas pelo HPV-16 [76, 87, 117].

Adolescentes, que utilizam contraceptivos orais tem uma incidência significativamente menor de infecção por HPV em relação às que não utilizam (OR 0,54; IC95%: 0,32-0,94). Esta correlação inversa foi controversa, já que os hormônios esteróides têm sido considerados um fator importante na patogênese do câncer cervical. Uma vez que adolescentes possuem uma média mais baixa de níveis estrogênicos em relação às mulheres adultas, há uma possibilidade de que, estrogênios contidos em contraceptivos orais, ativem o sistema imune [113]. Brabin (2002) [87] confirma este relato e sugere que os hormônios contraceptivos aumentam a imunidade ao HPV em mulheres jovens, quando expostas pela primeira vez à infecção. Entretanto, uma vez persistindo a infecção viral, o efeito protetor desaparece e, os contraceptivos podem ser considerados co-fatores na carcinogênese.

Não existem muitos dados que avaliem o mecanismo pelo qual a influência hormonal pode modular o risco de progressão da doença cervical avançada entre as mulheres infectadas[76].

O estrogênio e a progesterona participam do processo de apoptose programado pela proteína E2 do HPV. Acredita-se que, na presença de E2, os hormônios possam proteger o epitélio contra o desenvolvimento de neoplasia cervical. Do contrário, na ausência da proteína E2, estes hormônios, provavelmente, atuem como co-fatores na carcinogênese, sejam por sua ação na expressão dos genes virais ou por outras vias ainda desconhecidas [38].

Em estudo desenvolvido, Lacey Jr e cols. (2000) [99] comparando a presença de receptores de estrógenos e progesterona em adenocarcinoma e carcinoma escamoso, verificaram uma relação positiva entre a presença destes receptores hormonais, a infiltração celular no estroma e a reação peritumoral de fibrina, bem como, a presença de um maior número de

receptores hormonais em adenocarcinoma. Concluíram também, que a presença destes receptores poderiam servir como fator prognóstico, já que nas pacientes receptoras-positivas, a sobrevida era maior.

Dados indicam que a mudança hormonal ocorrida na gestação, poderia modular a resposta imune ao HPV e influenciar o risco de persistência e progressão da lesão [118], podendo ser considerada um provável fator de risco [119]. Nesta fase hormonal, é verificada a produção de um elevado número de cópias virais associada a um quadro clínico de expressão máxima da infecção genital, ocorrendo rápida regressão no puerpério. Sua relação está associada com a formação de um complexo hormônio-receptor, o qual se liga a seqüências específicas do DNA e participa do mecanismo de transcrição dos genes virais [120].

A redução de imunocompetência nas mulheres grávidas ocorre devido à diminuição das células NK, bem como, da resposta mediada pelas células Th, além da redução de imunoglobulinas A e G (IgA e IgG) na mucosa cervical. Estes eventos, associados à ação dos hormônios nos receptores esteróides presentes no HPV, favorecem a replicação viral [119]. Os vários estudos relacionando o número de gestações com o risco de desenvolver a neoplasia cervical, concluíram que mulheres que tiveram mais de dois filhos possuem um risco maior, sendo que, gravidez precoce (antes dos 18 anos) pode elevar em três vezes o risco de desenvolver o câncer cervical [59, 76, 93].

Pelo exposto, ainda é controverso na literatura o papel dos hormônios esteróides na gênese do câncer cervical causada pelo HPV. Mais estudos, demonstrando esta relação, ainda são necessários para maiores definições.

Poucos estudos têm relatado a importância do uso de métodos anticoncepcionais como o dispositivo intra-uterino (DIU) com relação ao desenvolvimento de neoplasias. Para uma

população de mulheres indianas americanas, o estudo demonstrou um risco aumentado para NIC II/III nas portadoras do vírus HPV (OR=3,1 IC95%:1,7-5,7), com o uso permanente de DIU (OR=3,0, IC 95%: 1,4-6,1) e freqüente (OR=4,1, IC95%: 1,1-14,6), após ajustamento para fatores de confusão. Mulheres com mais de três partos (OR=5,2; IC95%: 2,4-11,0) e história de infertilidade também estavam associadas com diagnóstico de NIC II/III (OR=2,1; IC95%: 1,0-4,2) [121].

## **1.5. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

### **1.5.1. DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO**

A sensibilidade e especificidade do diagnóstico em esfregaços cérvico-vaginais têm sido discutidas desde a sua introdução, por George Papanicolaou em 1928, como forma de rastreamento do câncer cervical. Variáveis múltiplas e artefatos influenciam a presteza da detecção nos esfregaços, incluindo preparação, fixação e coloração, bem como o adequado método de coleta e uma interpretação correta [10, 122], o que pode levar a resultados falso-positivos, como também, falso-negativos [123]. Esses últimos são os mais temidos, pois podem retardar o início do tratamento das pacientes.

A triagem citológica envolve diferentes graus de lesão: Lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau (LSIL) relacionada mais aos HPV 6 e 11; Lesão escamosa intra-epitelial de alto grau (HSIL), aos HPV 16 e 18, bem como, no diagnóstico de câncer invasor. Já os HPV 31, 33 e 35 estão associados a um risco intermediário de desenvolver a lesão de alto grau [45].

O diagnóstico citológico de esfregaços atípicos, por vezes, gera dúvidas. O sistema Bethesda, 1988, atualizado em 2001 [124] foi proposto, como forma de reduzir resultados

contraditórios ou duvidosos, com objetivo de descartar exames colposcópicos desnecessários e padronizar a nomenclatura citológica internacional dos esfregaços cervicais.[125, 126] .

Lonky e colaboradores [127] em 1999 demonstraram que somente a citologia não poderia prever quais mulheres tem câncer ou lesões precursoras de câncer de alto grau. A demora na colposcopia e da biópsia em mulheres com anormalidades de baixo grau acarreta o atraso no diagnóstico definitivo das lesões intraepiteliais e o tratamento necessário.

Estudo comparando a citologia analisada pelo método convencional e preparada em base líquida, demonstrou uma redução no tempo de análise da lâmina 3 a 4 minutos, com melhora na adequação da amostra, obtendo assim, uma maior sensibilidade e especificidade do que o método convencional [123].

Tem sido relatado que as manifestações citológicas do HPV são mais freqüentes em mulheres mais jovens do que nas mais velhas. Também, esfregaços obtidos nas diferentes faixas etárias, não necessariamente revelam o mesmo padrão citológico em pacientes que albergam o vírus, visto que muitas vezes, a infecção é transitória [128].

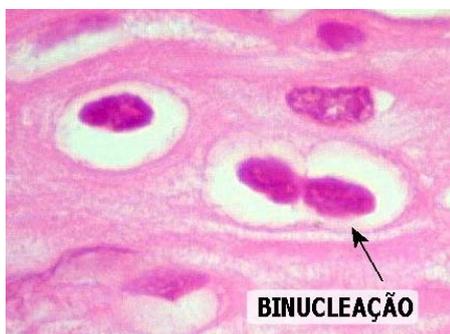
A replicação viral nas células do epitélio é acompanhada por alterações morfológicas, resultando nas características dos efeitos patogênicos da infecção viral, permitindo o diagnóstico da infecção clínica através do esfregaço cervical e de biópsias, com certo grau de acurácia [51].

Morfológicamente, a infecção viral ativa é manifestada pela proliferação celular (acantose), a qual é ativada por um efeito mitogênico das proteínas codificadas pelos genes precoces. A síntese do DNA viral através das camadas para-basal e intermediária leva ao aumento nuclear, binucleação e hiperchromasia (Figs nº 6 e 7).

Os eventos tardios provocam degeneração nuclear, e cavidade citoplasmática, denominada de coilocitose (Fig nº 8), alteração que se observa na camada superficial e intermediária do epitélio escamoso [45].



**Figura 6:** Hiper Cromasia  
**Fonte:** [www.pgmacline.es](http://www.pgmacline.es)



**Figura 7:** Binucleação  
**Fonte:** [www.fcm.unicamp.br](http://www.fcm.unicamp.br)



**Figura 8:** Coilócitos

**Fonte:** [www.ecplanet.com/](http://www.ecplanet.com/)

A coilocitose é considerada um efeito citopático específico, sendo marca da infecção clínica pelo vírus HPV. Foi sugerido que em pacientes portadoras de NIC I, a presença de extensiva atipia coilocítica é marca da infecção por HPV de alto risco [45, 51].

A histologia permite a identificação de neoplasia intraepitelial, a qual pode estar associada a viroses potencialmente oncogênicas e que são de risco para a progressão até o câncer. Entretanto, a histologia não permite a predição do tipo de papilomavírus associado ao efeito citopático. A interpretação histológica é difícil quando existem alterações mínimas associadas ao vírus; não permitindo a identificação da infecção latente [129].

Atualmente, o rastreamento do câncer de cérvix uterina é feito através da realização periódica do exame de Papanicolaou. Apesar de seu êxito na redução das taxas de morbidade e mortalidade por este tipo de câncer, o teste citológico tem limitações importantes, sendo a ocorrência freqüente de resultados falso-negativos, a principal delas. Além disso, mesmo com uma especificidade de aproximadamente 98,0%, o sucesso do teste é limitado pela sua baixa sensibilidade (aproximadamente 50,0%) [130, 131].

As taxas de falso-negativos para lesões cervicais pré-malignas e câncer cervical ficam entre 15,0 e 50,0%, enquanto que taxas de falso-positivos de 30,0% já foram relatadas [132]. Essas falhas podem advir de erros na coleta da amostra, pela ausência de células diagnósticas, preparação das pacientes, fixação e coloração das lâminas ou podem refletir erros de interpretação [122, 133].

Desta forma, como método de controle de qualidade, o Centro para Controle de Doenças (CDC) recomenda a revisão de 10,0% de todas as lâminas negativas com objetivo de assegurar fidelidade nos resultados. Outra forma de fazer o controle de qualidade seria comparar resultados da citologia com a histologia [134].

Em estudo realizado, foi demonstrada a contribuição da colposcopia e da histologia realizadas após a detecção de alterações citológicas identificadas ao exame de Papanicolaou. Verificaram que, do total de casos histologicamente confirmados como lesão de alto grau, uma grande proporção (38,8% das mulheres), tinha diagnóstico de ASC-US no exame citológico[135].

Assim, a citologia, apesar do baixo custo, pode não ser conclusiva e despertar controvérsias no diagnóstico proposto. A busca por métodos não dispendiosos, de boa reprodutibilidade e especificidade, pode trazer benefícios às pacientes, prevenindo o desenvolvimento das lesões já no início do seu estabelecimento.

### **1.5.2. COLPOSCOPIA:**

A colposcopia é um exame de imagem, o qual permite visualizar a vagina e o colo do útero através de um aparelho, com um aumento de 10,0 a 40,0 vezes do tamanho normal. É um exame de rotina no diagnóstico precoce do câncer do colo uterino. Proporciona, sob iluminação intensa e centralizada do colo e/ ou mucosa vaginal, uma visão ampliada e minuciosa das lesões patológicas aí presentes [136].

É um exame inócuo e rápido possibilitando, com eficácia, realizar biópsias nos locais suspeitos de maior gravidade [136].

Muitos clínicos utilizam a colposcopia para todas as mulheres com diagnóstico citológico de células escamosas de significado indeterminado (ASC-US), resultando na inclusão de três vezes mais mulheres na triagem colposcópica, quando poderiam ser incluídas somente mulheres que apresentem lesão escamosa intraepitelial [125].

Sherman e cols. (2002) [137], discutem em estudo randomizado, o efeito da idade e da carga viral na triagem colposcópica. Verificaram que, nas mulheres com ASC-US, o teste do HPV apresenta elevada sensibilidade para detectar NIC 3 ou câncer, com valores dramaticamente reduzidos para mulheres mais velhas. Somente a realização do teste para DNA-HPV ou o exame citopatológico repetido podem ser úteis na triagem para mulheres com diagnóstico de LSIL (lesão intra-epitelial de baixo grau – NIC 1).

Quando a proliferação epitelial é acompanhada pela vascularização dos capilares, o estroma se projeta, resultando numa lesão exofítica, denominada, condiloma acumulado de superfície papilar (Figura 13).



**Figura 9:** Imagem colposcópica de neoplasia

**Fonte:** [www.medscape.com/viewarticle/408861\\_5](http://www.medscape.com/viewarticle/408861_5)

Embora a morfologia sozinha seja conclusiva na distinção das lesões de alto e baixo grau, o valor preditivo na definição dos diferentes graus das lesões benignas, muitas vezes é difícil. Além disso, a concordância inter e intra-observadores (reprodutibilidade) para estas lesões são baixos.

Assim sendo, mesmo que a infecção possa ser sugerida pela citologia, histologia e colposcopia, o diagnóstico específico requer a demonstração do DNA viral [138]. Para estes autores então, o teste de DNA- HPV aliado à citologia aprimora a eficiência diagnóstica de exames citológicos equívocos evitando, desta forma, colposcopias e futuras intervenções médicas desnecessárias.

### **1.5.3. TÉCNICAS MOLECULARES**

Com o início da biologia molecular como ciência, vários aportes impulsionaram a vertiginosa revolução tecnológica vista atualmente. Estas incluem o uso de “enzimas de restrição”, que cortam o DNA em seqüências específicas, técnica de seqüenciamento de ácido nucléico e proteína, análises do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição do DNA (RFLP) e finalmente a técnica de PCR [129].

Sendo assim, o diagnóstico da infecção pelo HPV depende de técnicas moleculares como a hibridização do DNA ou pela amplificação de ácidos nucléicos. Várias técnicas de PCR têm sido desenvolvidas para detectar o espectro dos diferentes tipos de HPV tróficos à mucosa, empregando *primers consenso* ou degenerados. Estes métodos apresentam importantes limitações como alto custo, técnicas demoradas e pouco específicas, entretanto, bastante sensíveis [139]. Testes para DNA-HPV de alto risco como a captura híbrida II, tem se mostrado muito sensível na

detecção do HPV e útil para a triagem de lâminas com diagnóstico de ASCUS, entretanto, apresenta baixa especificidade [140].

Técnicas normalmente usadas para detecção do HPV/DNA em esfregaços cérvico-vaginais podem ser classificadas em três categorias: Métodos de amplificação do DNA (incluindo vários ensaios baseados na PCR), testes de amplificação de sinais (teste da captura híbrida em tubos) e métodos de não-amplificação (Southern-blotting e Dot-blot). Os primeiros, de amplificação, são normalmente mais sensíveis. [141].

A captura híbrida e a reação da PCR representam uma evolução no diagnóstico e triagem do câncer cervical e seus precursores. O uso destas novas metodologias permite maior acurácia diagnóstica, complementando os resultados obtidos através da citologia e histopatologia. Entretanto, deve ser salientado que, a citologia tem baixa sensibilidade, variando entre 50-99%, apresentando até 29,7% de resultados falso-negativos [11, 142, 143].

Estudos demonstram que a sensibilidade do exame de captura híbrida II (1.0 pg/célula) é muito superior à apresentada pela hibridização molecular *in situ* (300 cópias/ célula) e é similar à reação em cadeia da polimerase [144].

Cox, e cols [125], bem como, Manos e cols [138], confirmaram o teste de captura híbrida para detecção viral de boa acurácia e valor preditivo, em pacientes portadoras de diagnóstico citológico de ASC-US, já que muitas vezes gera dúvidas na interpretação.

#### **1.5.3.1. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR):**

A PCR, técnica de amplificação do DNA “in vitro”, que emprega *primers* específicos, é um método qualitativo com alta sensibilidade analítica, que detecta quantidades diminutas de vírus. Após o resultado da PCR, a tipagem viral é realizada, utilizando o método de

fragmentação por enzima de restrição (RFLP) do gene L1 que codifica a proteína do capsídeo viral. Esta técnica apresenta como vantagem, a possibilidade de definir exatamente qual o tipo viral envolvido e de detectar infecções mistas. Apresenta sensibilidade igual ou até mesmo superior à captura híbrida [145-148]. A importância de utilizar testes de HPV em programas de rastreamento consiste em se poder detectar os tipos mais agressores com maior sensibilidade.

Esta pode ser realizada em esfregaços citológicos, lavagens, biópsias por congelamento ou tecidos embebidos em parafina. O DNA alvo destes espécimes deve ser isolado, utilizando uma digestão não-iônica detergente/protease ou por congelamento/e aquecimento do material celular. Outros materiais como tecidos fixados em formol ou parafinados, sangue, sêmen, urina, *swabs* uretrais, água e restos teciduais em decomposição, também podem ser usados [129], tendo com o objetivo de detectar e caracterizar os diferentes tipos de HPV, empregando seqüências de consenso [31, 149-151].

A técnica de PCR em tempo real (*Real Time PCR*) tem a propriedade de distinguir seqüências próximas com base na amplificação e seguida pela análise da temperatura de anelamento do DNA, sendo uma opção rápida para a identificação do vírus, com separação entre os tipos mais agressores, 16 e 18 [139].

White e cols. (1998) [79] demonstraram uma complexa relação entre sensibilidade e especificidade para o teste HPV/DNA e dados clínicos como idade da paciente. Embora o teste reflexo de DNA do HPV tenha potencial para detectar muitos casos de lesão intra-epitelial de alto grau, a baixa especificidade em mulheres mais jovens e a avaliação de esfregaços de lesão intra-epitelial de baixo grau sugerem que é mais útil para mulheres mais idosas e naqueles testes cujo resultado de Papanicolaou apresentou resultado de ASC-US [79].

A PCR pode ser utilizada para demonstrar a associação entre muitas doenças infecciosas e o DNA de agentes contaminantes. Este instrumento diagnóstico auxilia também, em infecções de lesões orais. Resultados falso-positivos ocorrem mais comumente por contaminação com ácidos nucleicos e podem advir de produtos da PCR ( amplicons) previamente realizados no laboratório [152].

Assim sendo, o método de amplificação pela PCR é empregado para o diagnóstico em função da habilidade de detectar rapidamente estes agentes patogênicos sexualmente transmitidos como *Herpes simplex*, *Chlamydia trachomatis*, bem como o HPV. Para este último, possibilita também, a detecção de tipos de alto risco ou oncogênicos, diferenciando daqueles presentes, normalmente, em lesões benignas ou de baixo risco[153, 154].

Muñoz (2000) [16], avaliou mais de 1000 biópsias provenientes de 22 países, categorizadas como negativas pelo IARC em 1995 e, de cada centro, foram selecionados 50 casos de câncer cervical invasor. Inicialmente, o DNA do HPV foi detectado em 93% dos materiais usando *primers consensus* da região L1 (PGMY09/MY11), os restantes 7%, originalmente classificados como negativos, foram submetidos a PCR, utilizando *primers* mais sensíveis, com controle na quantidade e qualidade do tecido maligno testado. Para isto, utilizando *primers consensus* da região L1 GP5+/GP6+, foram detectados 95.7% dos casos; com *primers* da região E7 de 14 tipos de HPV de alto grau, foram detectados 98,1% e, se levarmos em conta somente os casos de malignidade, este percentual subiu para 99,7%. Desta forma, pôde-se correlacionar a presença de DNA-HPV na quase totalidade dos casos de câncer de colo.

### **1.5.3.2. CAPTURA HÍBRIDA:**

O diagnóstico de HPV pela captura híbrida é de fácil execução e rápido na obtenção de resultados. Apresenta elevada sensibilidade, detectando infecções latentes e sub-clínicas. A coleta

para análise é realizada em meio líquido e possibilita tanto avaliação citológica oncótica, quanto avaliação de bases moleculares [155].

Em estudo desenvolvido por Roteli-Martins e cols. (2001) [51] o diagnóstico da presença viral por captura híbrida ou por hibridização “in situ” estava significativamente relacionado com diagnóstico de NIC II ou NIC III em biópsias. O sinal emitido (unidades relativas de luz/controlado positivo) foi maior e mais intenso em casos mais graves; e, este fato foi confirmado pela histologia [51].

A Captura híbrida de 1ª geração foi desenvolvida há poucos anos. Entretanto, a PCR e a histologia apresentam maior sensibilidade, embora a especificidade ainda seja maior na primeira. Assim, a captura híbrida de 2ª geração aumentou o número de cópias do DNA através da reformulação dos reagentes de hibridização e ampliou a detecção de outros tipos virais de risco intermediário e de alto risco, além de substituir o uso de tubos por placas [125, 141, 156-158].

A captura híbrida se mostrou efetiva em estudo realizado por Cox e cols. (1995) [125], o qual verificaram as pacientes positivas para o DNA-HPV, com ASC-US ao exame citológico e que foram examinadas por colposcopia. A sensibilidade do teste foi mantida, entretanto, o teste foi mais específico para aquelas que possuíam níveis elevados de DNA-HPV, associados a tipos virais de maior risco.

Cope e cols. (1997) [141] compararam a PCR, utilizando primer L1 de consensus e o teste da captura híbrida em 596 amostras cérvico-vaginais. No geral, os dois métodos concordaram em 93% de positividade para um dos 14 tipos de HPV detectáveis. Neste estudo, a PCR apresentou-se mais sensível na detecção do DNA- HPV, entretanto, a captura híbrida pode ser mais útil na detecção de lesões escamosas intra-epiteliais [125]. Atualmente o teste da captura híbrida II tem sido utilizado em vários estudos epidemiológicos [159-163] com objetivos de verificar a

prevalência dos tipos virais por faixa etária, tipagem do DNA-HPV, apresentando valor preditivo negativo elevado e ótima correlação com achados citológicos e histopatológicos.

### **1.5.3. OUTRAS TÉCNICAS DE DETECÇÃO:**

A detecção de peptídios através do teste de ELISA – ensaio imunoenzimático que utiliza pequenas frações de epítopos lineares de proteínas, apresenta baixos níveis de sensibilidade e especificidade. Entretanto, Meschede e cols. (1998) [164] utilizando antígenos recombinantes altamente purificados, detectaram anticorpos contra proteínas E6 e E7 dos HPV 16 e 18 de pacientes, com câncer cervical invasor, para os quais o rastreamento através da citologia não foi possível o diagnóstico.

Teste como radio-imuno-precipitação (RIPAs) com proteínas naturais pode também detectar anticorpos contra epítopos conformacionais com maior sensibilidade e especificidade. Entretanto, o processamento técnico é complexo, requer sofisticada aparelhagem e, portanto não é acessível para rotina [164].

Em pesquisa realizada em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, Nonnemacher e cols. (2002) [69] verificaram a presença de anticorpos IgG contra HPV-16 L1 VLPs (vírus-like-particles) e HPV-16,-18, -6 e -11 L1 VLPs como mistura antigênica, em 976 mulheres. Concluíram que a soropositividade para HPV-16 e para a mistura antigênica parece ser melhor indicador de atividade sexual passada do que atual, e que, a resposta humoral frente ao HPV-16 ou HPV- 6,-11,-16 e -18 não é um indicador de lesões cervicais em pacientes de baixo risco.

Uma vez que HPV-16 é o mais prevalente HPV de alto risco, uma proteção eficaz contra o câncer cervical requer uma maior abrangência pela produção de anticorpos cruzados contra múltiplos tipos de HPV. Estudos recentes demonstram a neutralização do HPV 16 através da

formação de anticorpos contra a fração L1 do capsídio viral. Além disso, estudos cruzados de proteção contra HPV de alto e baixo grau, têm sido testados [165, 166] com a finalidade de verificar a capacidade de partículas específicas virais neutralizarem a infecção através da formação de anticorpos e possibilitar a vacinação contra vários tipos de HPV [79].

#### **1.5.4. IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ):**

A identificação de alterações genéticas pode ser efetuada através da técnica de imunohistoquímica, técnica de coloração que utiliza anticorpos monoclonais em reações imunológicas, empregando marcadores específicos, a qual vem ocupando lugar de destaque no estudo de vários tipos de tumores. Busca identificar antígenos específicos em células ou tecidos neoplásicos [167].

É baseada, na conjugação de marcadores distintos com moléculas de imunoglobulinas (anticorpos mono ou policlonais). Logo que produzida a união antígeno-anticorpo, o marcador é localizado por uma reação tintorial e desta maneira pode ser detectada a estrutura em que se localiza o antígeno. Nos métodos de imunohistoquímica se utiliza uma reação enzima-substrato que transforma um cromógeno incolor em um produto final corado [129].

A reação antígeno-anticorpo pode ser identificada à microscopia ótica de transmissão, através de vários procedimentos, em que se incluem imunocomplexos enzima-anti-enzima e métodos com marcação prévia, como avidina – biotina- peroxidase [168]. Através da alteração na expressão e intensidade das colorações, observa-se a inativação ou super-ativação do gene, dependendo do seu papel no ciclo celular [169].

## **2. A CARCINOGENESE E O PAPILOMAVÍRUS HUMANO:**

### **2.1. CICLO CELULAR**

O câncer é uma desordem do ciclo celular e, entender como este processo é controlado é fundamental para compreender os mecanismos que estão envolvidos na proliferação celular.

Os eventos do ciclo celular ocorrem em uma ordem fixa: iniciam pela replicação do DNA (fase S), seguem pelo intervalo (fase G<sub>2</sub>, gap), mitose e citocinese (fase M) e outro intervalo (fase G<sub>1</sub>), seguindo novamente, pela replicação do DNA, e assim por diante. As células podem sair do ciclo e entrar na fase G<sub>0</sub>, que é o seu estado quiescente [167] (Figura 16).

O início da replicação do DNA marca a transição da fase G<sub>1</sub> para a fase S e esta, encerra-se, quando todo DNA tenha sido replicado. Durante a fase S, o conteúdo de DNA aumenta de um valor diplóide de  $2n$  para o valor completo de replicação  $4n$ .

O período compreendido desde o final da fase S (síntese) até a mitose é chamado de G<sub>2</sub>; e neste, a célula apresenta dois conjuntos diplóides completos de cromossomos [170, 171].

Quando ocorre dano ao DNA, este necessita ser reparado, o que pode atrasar a mitose e a divisão celulares. O sistema-controle do ciclo celular consegue controlar tudo por meio de freios-moleculares, que podem parar o ciclo nos pontos de checagem, em G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.

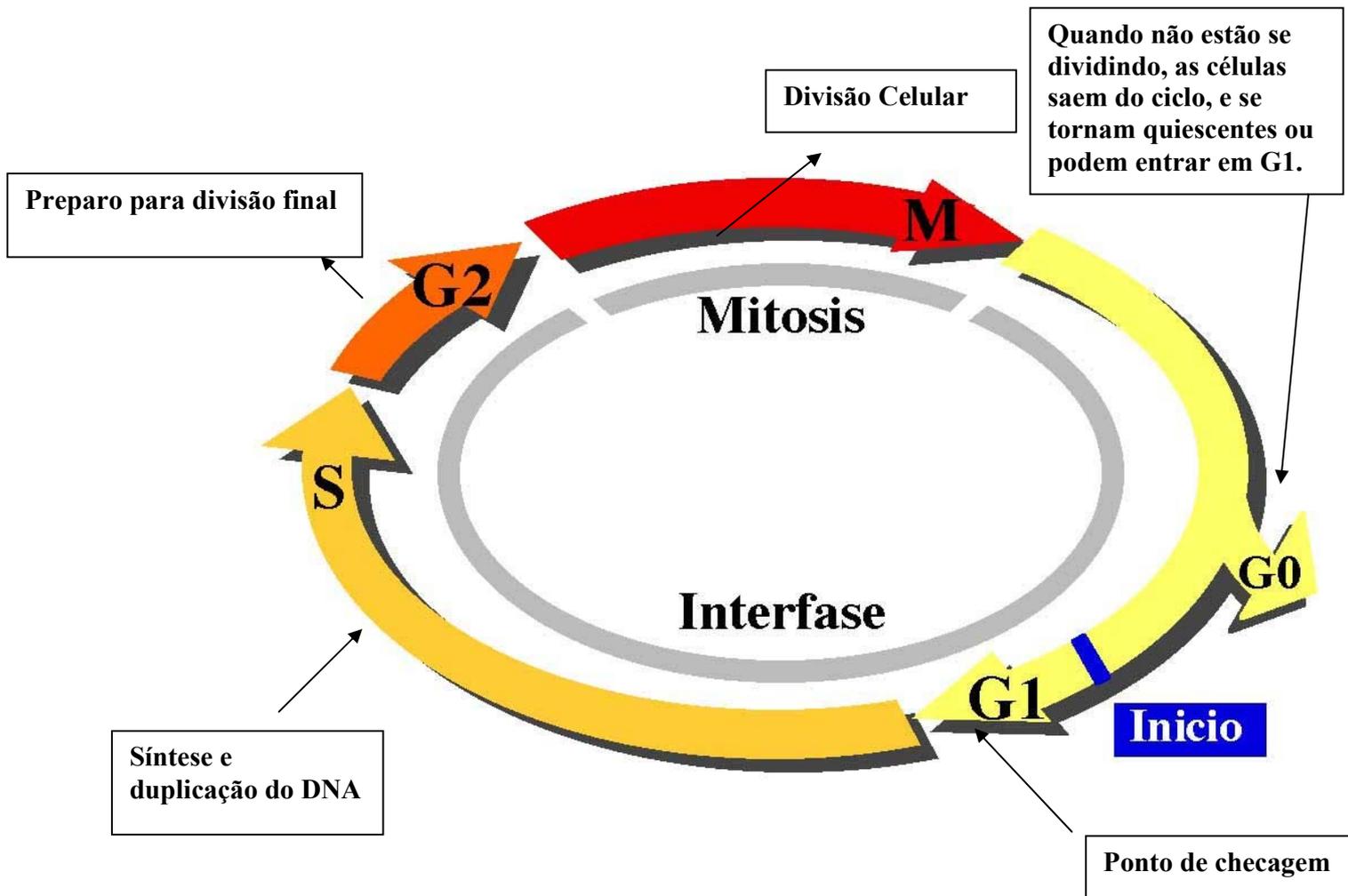


Figura 10: Etapas do ciclo celular

Fonte:

[http://www.ciencia.cl/CienciaAIDia/volumen3/numero1/articulos/calzada/Figura\\_2.jpgf](http://www.ciencia.cl/CienciaAIDia/volumen3/numero1/articulos/calzada/Figura_2.jpgf)

A relação entre a presença do DNA de certos tipos de HPV e a progressão das lesões até o câncer cervical tem sido descrita por muitos autores [13, 34, 39, 172].

A ativação da infecção que está latente, epissomal, resultando na manifestação sintomática, se dá em função das interações do vírus na célula, pela suscetibilidade do hospedeiro e pela presença de vários co-fatores envolvidos.

O Papilomavírus Humano contribuiu para o conhecimento da carcinogênese, através do bloqueio das proteínas celulares que prevêm o controle da divisão celular; assim como, compromete a resposta imune permitindo, o estabelecimento da infecção [34, 164].

Dois oncogenes virais, E6 e E7, estão consistentemente expressos no câncer cervical HPV positivo e, sua expressão é essencial para iniciar e manter o fenótipo celular neoplásico. A instabilidade genômica contribui para a formação dos tumores e, pelo menos de seis a oito mutações são necessárias para o desenvolvimento do câncer.

## **2.2. ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR: KI67 (MIB-1)**

Ki-67 (MIB-1) é um antígeno de proliferação celular, não-histona, presente no núcleo da célula que é expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0 e a positividade deste marcador tem sido usada como indicador promissor nas lesões cervicais displásicas. MIB-1 é um anticorpo monoclonal não-histona que reconhece a proteína Ki-67.

Vários estudos imuno-histoquímicos empregando o anticorpo monoclonal anti-Ki-67 [173-177] tem mostrado uma relação entre o Ki67, o grau histológico e o comportamento do tumor, sugerindo que a expressão deste marcador, fornece informações prognósticas em doenças do tecido conectivo, doenças linfoproliferativas e, em alguns casos de carcinomas [174].

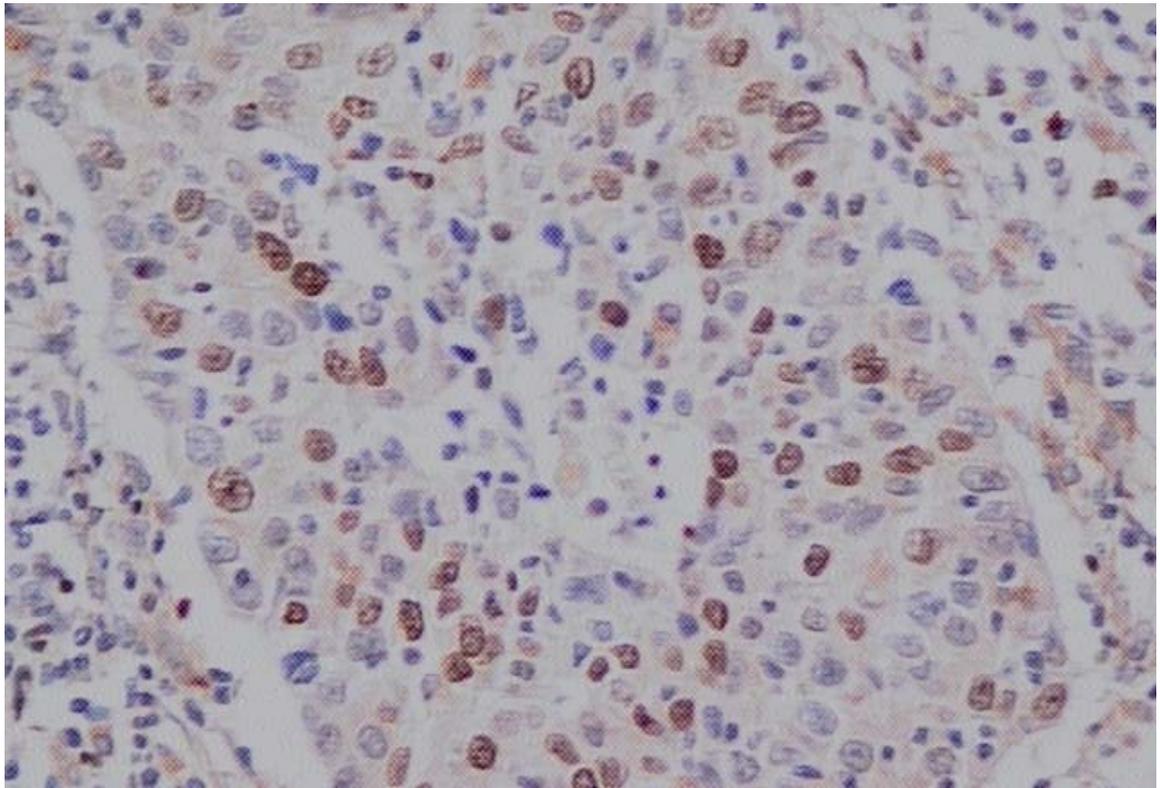
A expressão de Ki67 foi estudada também, em relação à presença e atividade das células *Natural Killer* (NK), uma vez que estas estão envolvidas com a defesa imunológica, no desenvolvimento e sobrevivência tumoral, bem como na ocorrência de metástases em carcinoma cervical. Foi verificada uma relação inversa entre a atividade das células NK e a expressão de Ki67. Já, com relação à infiltração de linfonodos e a capacidade de formar metástases, a relação foi positiva para Ki67 [174].

Estudos prévios [178, 179] têm verificado que o padrão assim como, a quantidade de expressão de MIB-1 e a atividade mitótica, demonstrada através da técnica de hematoxilina-eosina (H&E), se apresentaram úteis na distinção de condiloma e/ou displasia das alterações inflamatórias, metaplasia escamosa imatura e atrofia do colo uterino.

Analisando a questão hormonal, através dos receptores de estrogênio e progesterona, foi detectada uma correlação positiva entre a expressão destes marcadores hormonais e a presença do Ki-67 em lesões HPV positivas do colo uterino. Foi verificado que as pacientes com lesões pré-cancerosas, apresentavam sinais clínicos de hiperestrogenemia, o qual levou à proliferação de células parabasais, sensíveis a concentração de estrogênio [180].

Tem sido relatada também, a expressão de Ki-67 na diferenciação de modificações pseudo-coilocíticas e atróficas daquelas de displasia, bem como, na avaliação de margens cauterizadas em cones biopsiados [177].

Segundo Propioleck e cols. (2004) [179], no colo uterino, o número de núcleos positivos na extensão da membrana basal e o índice de estratificação (a distância dos núcleos positivos da membrana basal, divididos pela espessura do epitélio) são fortes indicadores dos diferentes graus de displasia (Figura 11).



**Figura 11:** Expressão Nuclear Forte de Ki67 (400x)

Segundo Kruse e cols. (2004) [181], a expressão e a análise quantitativa de Ki-67 pode ser utilizada na avaliação de biópsias que tem forte indicação de progressão, sendo considerado um marcador reprodutível com considerável valor prognóstico.

Em outra análise desenvolvida também por Kruse e cols. (2004) ao avaliar Ki-67 em conjunto com outros parâmetros de proliferação, tais como Rb (retinoblastoma), p53, ciclina A, E e D, p16, p21, p27 e telomerase; bem como, marcadores de diferenciação, os quais sejam involucrina, CK13 e CK14 em diferentes locais no epitélio, foi demonstrado que a combinação de Ki-67, Rb, CK13 e CK14, forneceu informação acurada acerca do risco das lesões intraepiteliais cervicais progredirem [182].

Estudos demonstram que a imunoquantificação pelo antígeno nuclear Ki67 é um marcador sensível do grau, presença ou ausência de HPV oncogênicos e, possivelmente do seu comportamento biológico. A avaliação imuno-histoquímica quantitativa de Ki67 é importante também, para esclarecer diferenças interobservadores nos graus mais severos [50, 169].

Em estudo empregando a imuno-histoquímica para Ki67 e p16<sup>INK4a</sup> Walts e cols. (2006) [183] confirmaram que, quando analisados em conjunto com a coloração para H&E (hematoxilina e eosina) estes marcadores são úteis na graduação das lesões de neoplasia intraepitelial anal também .

Desta forma, a imuno-histoquímica para Ki67, tem se mostrado um potente auxiliar na confirmação das lesões potencialmente ativas à progressão.

### **2.3. GENES SUPRESSORES TUMORAIS**

Os pontos de controle do ciclo celular têm uma função importante na manutenção da fidelidade e integridade da replicação e reparo do genoma. A dinâmica do ciclo está regulada por estes pontos de controle que atuam na transcrição dos genes que codificam sinais positivos, as CDK (quinases dependente de ciclina) e das ciclinas. Os processos de regulação por retro-alimentação positiva e negativa, também contribuem para o progresso no ciclo celular [184].

Os controles negativos, nesta progressão, estão presentes durante a proliferação, diferenciação, senescência e morte celular e são importantes na gênese do tumor. Os pontos de controle aparecem em duas ocasiões: o primeiro no final da fase G1 e entrada na fase S do ciclo celular e o outro, na transição da fase G2 até a fase M [167].

De maneira geral, a interrupção da proliferação celular ocorre quando a integridade do genoma foi comprometida [167]. Alterações no processo de interrupção do ciclo permitem que as células, com genomas instáveis progridam até células cancerosas. Tais circunstâncias poderiam

incluir: a senescência celular, onde os telômeros são perdidos ou se encurtam e se formam, então, os cromossomos dicêntricos instáveis; a morte celular por apoptose, onde as nucleases que degradam o DNA estão alteradas, bem como, a natureza da resposta imune do hospedeiro [185].

A maior parte dos tumores alberga uma ou mais anormalidades nos genes supressores tumorais. Estas alterações incluem mutações, translocações, ou deleções. Além disto, pelo menos dois mecanismos epigenéticos, a hipermetilação da ilha CpG na região promotora do gene e a aberrante acetilação de histonas (especialmente a histona H4), podem silenciar genes supressores tumorais numa variedade de tumores [186, 187]

Os produtos de três genes supressores tumorais importantes, RB (retinoblastoma), p53 e p16 estão inter-relacionados bioquimicamente.

O gene RB caracteriza o cromossomo 13q14 e possui vários efetores que controlam o ciclo, entre os quais o fator de transcrição E2F. [187]. RB é um ponto de restrição importante no ciclo celular; e, não só pode estar mutada em muitos tumores, como também, pode ser alvo de alguns vírus, como antígeno T SV-40 (simian vírus 40), adenovírus E1A e HPV E7 [188].

O gene p53 é considerado “guardião” do genoma, devido ao fato de transmitir sinais a partir de várias formas de dano ao DNA, levando ao retardo no ciclo ou a apoptose [189].

Mutações em p15<sup>INK4B</sup>, p14<sup>ARF</sup>/p16<sup>INK4A</sup> são raras, e se presentes, podem interferir com sua expressão ou função supressora, sendo, portanto, um importante passo na evolução das doenças malignas [187]. Todas as deleções características ao cromossomo 9p21 atingem o locus da p16<sup>INK4A</sup>/p14<sup>ARF</sup>. Ambas as proteínas atuam como supressoras na transição G1-S, mesmo em rotas diferentes: a p16<sup>INK4A</sup> atua como um inibidor do complexo da ciclina D1/CDK4/6, enquanto p14<sup>ARF</sup> estabiliza a p53, pela inibição de MDM2 [190].

Portanto, o locus das proteínas p15<sup>INK4B</sup>/p16<sup>INK4A</sup> no cromossomo 9p21 é um ponto forte no desenvolvimento de tumores humanos e, aproximadamente, 50,0% das doenças malignas apresentam anormalidades em, pelo menos, um destes genes supressores tumorais.

### **3. HPV, CICLO CELULAR E A PROTEÍNA P16<sup>INK4A</sup>:**

O genótipo do câncer parece resultar de alterações no mecanismo de defesa celular, o que confere à célula auto-suficiência para o crescimento, insensibilidade aos sinais inibitórios, evasão dos programas de morte programada, manutenção da formação celular, invasão tecidual e metástases [191].

A identificação de quatro fases distintas do ciclo celular (fase S, fase M, G1 e G2), e, dos locais onde ocorrem os denominados “pontos de checagem”, contribuíram enormemente para as pesquisas sobre os eventos que controlam o ciclo celular [188].

Quando ativadas, através da ação do ATP, as CDKs fosforilam proteínas-chave na célula. Diferentes complexos de ciclina-cdks desencadeiam estágios do ciclo: MFP – fator promotor de mitose, complexo ciclina-cdk mitótico e o complexo ciclina-cdk de fase S, que promovem a progressão para a fase S, no ciclo celular [167].

A concentração de cada tipo de ciclina aumenta e logo diminui rapidamente em um determinado momento do ciclo, devido à degradação, pela ação da ubiquitina. A elevação da quantidade de ciclina auxilia na ativação da CDK correspondente, e a queda, faz com que a mesma se torne inativa [167].

As CDKs são ativadas por fosfatases, entre elas a Cdc25 responsáveis pela desfosforilação e por quinases, a CAK (CDK activating kinase= ciclina H/CDK7, pólo K, indireto) responsáveis

pela fosforilação. As CDKs são inibidas por proteínas inibitórias, as CKI (inibidoras de CDK, entre elas, p16, p21, p27, que agem sobre o complexo CDK/ciclina.

As células são induzidas a entrar no ciclo pela adição de fatores de crescimento, respondem pela imediata produção de ciclina D, a qual complexa-se com CDK4 ou CDK6, para progressão à fase G1 [192].

O complexo ciclina E/CDK2, atua em conjunto com a ciclina D/CDK4/6, controlam a passagem pelo ponto de restrição e assim, inicia-se a fase S e síntese de DNA. Os dois complexos da fase G1 favorecem a expressão da ciclina A que, acoplada à CDK2, permite o início da fase S e a entrada em G2.

A ciclina A também associa-se à CDK1 para promover a progressão na fase G2; enquanto o complexo ciclina B/CDK1 (MFP), leva a célula à mitose, com destruição da ciclina B, sinalizando a transição da metáfase à anáfase e, eventualmente, o início de um novo ciclo [167, 188].

Os dois pontos de checagem ou de restrição na célula garantem que o próximo estágio do ciclo não comece sem que o anterior termine. O 1º ponto ocorre em G1, no qual se dá a síntese de RNAs e proteínas e após, a célula entra na fase S do ciclo celular, na qual o DNA é sintetizado. O 2º ponto de restrição é no final da fase G2, antes de entrar em mitose, fase na qual a célula será dividida em duas células-filhas [193].

Células podem atrasar o ciclo celular nos pontos de controle, para reparar o DNA danificado. Caso não ocorra o reparo, os sinais nos pontos de controle do ciclo celular ativam a apoptose. A perda da integridade nestes pontos de controle leva a propagação de DNA, resultando em alterações permanentes do genoma.

Os pontos de controle que regulam a progressão do ciclo celular são rompidos com frequência nas células tumorais [193] e são:

a) as proteínas inibidoras de CDKs, as quais podem bloquear a união ou a atividade de um ou mais componentes do complexo CDK-ciclina,

b) suspensão da produção de componentes do sistema-controle do ciclo.

As quinases dependentes de ciclina são negativamente controladas por um grupo de proteínas relacionadas chamadas inibidores de CDK (CKIs), com duas famílias: INK4 e CIP/KIP.

A inibição na fase G1 do complexo cdk-ciclina representa papel chave no ponto de controle do ciclo celular. As cdk-ciclinas, complexam o pRB, causando a liberação do fator de transcrição E2F, o qual ativa genes, cujo o produto é importante para a fase S do ciclo [167, 170, 171]. O gene do Retinoblastoma (RB) é o alvo em muitas rotas de inibição do crescimento e é a forma pela qual os sinais inibitórios ocorrem, mantendo a célula na fase G1. Muitos destes sinais incluindo o fator inibitório do crescimento (TGF $\beta$ ) atuam através de inibidores de CDKs-ciclina e são chamados CKIs, os quais são encontrados ligados ao dímero CDK-ciclina em complexos inativos que evitam a fosforilação de Rb, impedindo a entrada na fase S do ciclo. Três CKIs estão bem caracterizadas: p15/p16 (INK4), p21 (cip1/WAF1) e p27 (KIP1).

A proteína p16<sup>INK4a</sup> é expressa no locus 9p21 do gene CDKN2A (cromossoma 9). Esta proteína interage e inibe a quinase dependente de ciclina (CDK4 e CDK6), na transição de G0/G1. p16<sup>INK4a</sup> não pode inibir a proliferação de células na ausência de RB, pois sua função é prever a ação da quinase cdk-ciclina utilizando RB como substrato. A ligação específica de p16 à CDK4 ou CDK6, inibe a fosforilação de Rb através do complexo CDK-ciclina-Rb, resultando

na retenção de Rb à E2F. Falhas na liberação de E2F ao final do ponto G1, bloqueia a entrada da célula para a fase S [167, 171, 194].

Conforme apresentado na figura 12, no caso do HPV, as oncoproteínas E6 e E7, exercem função importante na gênese das alterações neoplásicas. O oncogene E6 promove a degradação prematura da p53. Sendo esta, um fator de transcrição gênica, todos os genes por ela ativados deixam de ser codificados, como a proteína p21, inibidora de outro complexo CDK.

A oncoproteína E7 se liga à proteína supressora tumoral pRB, e favorece a liberação do fator de transcrição E2F. Como consequência, a transcrição do gene regulador de pRB é ativada e promove a passagem de G1 à fase S do ciclo celular [195, 196]. Além disso, E6 previne a apoptose, a qual é induzida pelos elevados níveis de E2F e E7 reforça a ação pela inibição da p16<sup>INK4A</sup> [196].

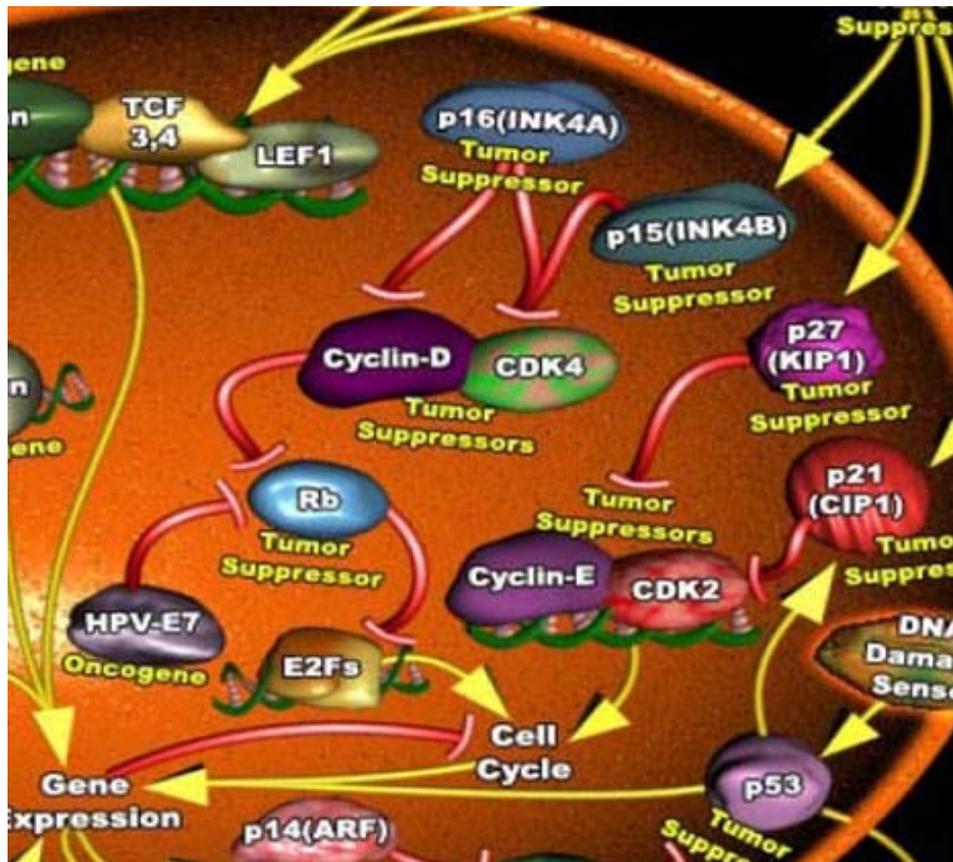


Figura 12: Alterações nos genes celulares nas infecções HPV induzidas

Fonte: [www.proteinlounge.com](http://www.proteinlounge.com)

Em estudo desenvolvido por Kang e cols. (2005), foi identificada uma associação positiva entre algumas alterações genéticas como a hipermetilação da ilha CPG de 15 genes, entre eles a  $p16^{INK4a}$  e, o polimorfismo do folato e de enzimas que metabolizam a metionina, como contribuintes para o desenvolvimento de câncer do colo uterino [197].

Portanto, a expressão de  $p16^{INK4a}$  modula o controle de *feed-back* negativo através da pRB, sendo que a perda ou inativação de pRB, através da oncoproteína E7 do HPV, resulta em aumento nos níveis de expressão de  $p16^{INK4a}$ ,

podem representar um específico e sensível marcador das células com expressão ativa nas infecções pelo HPV [198].

Em tecido normal, a hipofosforilação de pRb regula negativamente o ciclo, através de associação direta, a atividade de vários fatores de transcrição, incluindo membros da família E2F; desta forma, a atividade de CDK4 e CDK6 é controlada por vários inibidores da quinase dependente de ciclina, incluindo p16<sup>INK4a</sup> [199, 200].

### **3.1. ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE O PAPEL DA p16<sup>INK4A</sup> E SUA IMPORTÂNCIA NO COLO UTERINO**

Estudos enfatizando a importância de identificar a p16<sup>INK4A</sup> como fator prognóstico para alguns tipos de neoplasias, intensificaram-se nos últimos anos [201-204].

Entretanto, já em 1994, Nabori e cols.[205], em publicação na revista Nature, descreveram a inibição do gene p16 em tumores de pulmão, gliomas, melanoma e leucemia, bem como, as alterações citogenéticas no cromossomo 9p21.

A partir daí, outras pesquisas esclareceram o papel do gene do retinoblastoma e a associação do fator de transcrição E2F na indução da atividade inibitória da CDK [206, 207].

Em 1998, Sano e cols. [208] verificaram a detecção do gene P16 através da expressão do mRNA (RNA mensageiro) empregando a técnica da transcriptase reversa (RT-PCR) e, pela coloração através da técnica de imuno-histoquímica em cortes teciduais. Detectaram claramente, uma diferença no padrão de expressão da proteína nas lesões de baixo e de alto risco.

Da mesma forma, Munirajan e cols. (1998) [209], em estudo epidemiológico realizado na Índia, verificaram a presença do DNA-HPV, a expressão de p53 e da p16<sup>INK4a</sup> em carcinomas de

colo uterino em mulheres indianas. Detectaram um predomínio de HPV 16 (53,0%), a infecção viral e a mutação do gene p53 não foram eventos exclusivos na gênese das lesões, bem como, a expressão da p16<sup>INK4a</sup>, parece não desempenhar papel importante nestas mulheres.

As alterações genéticas no gene P16 foram intensamente buscadas a partir de 1999, em estudos realizados [210-213]. A inativação do gene P16 pode ocorrer, tanto por deleção, homozigose, mutação, hipermetilação ou perda de expressão da proteína e, estas modificações genéticas, são um fator presente nos tumores de cérvix uterina [194].

Wong e cols. (1999) [210] demonstraram que, a metilação do gene p16<sup>INK4A</sup> e, sua subsequente perda de função, representa papel importante na origem de 196 tumores ginecológicos primários.

Para detectar deleções e pontos de mutações no exon 2 do gene p16<sup>INK4B</sup> e exons 1,2 e 3 do gene p16<sup>INK4A</sup>, Kim e cols.(1998) [214] examinaram 57 tumores cervicais, tecidos normais e três linhagens celulares através da reação da polimerase em cadeia e seqüenciamento. Não foram observados deleções ou pontos de mutação, indicando não serem estes, eventos necessários para o desenvolvimento de neoplasia em pacientes HPV positivas.

Entretanto Nakashima e cols. (1999) [194] examinando tumores cervicais e endometriais através da transcriptase reversa (mRNA), detectaram a inativação dos genes p15<sup>INK4B</sup> e p16<sup>INK4A</sup>, tanto por deleção ou mutação, com perda da expressão em alguns tumores.

A perda de heterozigozidade (LOH) de Rb foi detectada em 29,0% das amostras de carcinoma de células escamosas de pacientes HPV positivas, bem como, alterações genéticas. Neste estudo, das 34 amostras analisadas, 24 (80,0%) das pacientes eram portadoras de HPV 16 e em 2 casos havia co-infecção com HPV-18 [211].

Apesar de estudos [194, 198, 208] apontarem uma elevada expressão da proteína p16<sup>INK4a</sup> (coloração forte) em lesão intra-epitelial escamosa causada pelo HPV-16, no estudo conduzido por Keating e cols. (2001) [46], essa associação não foi absoluta. Os autores acreditam que nem todos os tipos de HPV possuem o mesmo potencial de interromper o ciclo celular ou modificar a expressão do gene p16<sup>INK4a</sup>.

Ainda em 2001, outras análises epidemiológicas e genéticas realizadas [198, 212, 215], identificaram a expressão do gene p16<sup>INK4A</sup> em células displásicas e em eventos de hipermetilação. Comparando a hipermetilação em genes de adenocarcinomas e carcinomas epidermóides, a alteração nos genes p16 e DAPK (death-associated protein kinase), são mais frequentes em carcinoma de células escamosas do que nos casos de adenocarcinoma (p16, 39,0% versus 18,0%; DAPK, 61,0% versus 36,0%,  $p < 0,05$ ); já, para estes, a hipermetilação foi mais comum nos genes APC e HC-1 (APC, 60,0% versus 13,0% ( $p < 0,001$ ), HC-1, 63,0% versus 32,0% ( $p < 0,03$ ). Nenhum dos tecidos cervicais normais apresentaram metilação em algum gene [215].

Em 2002, uma revisão importante foi publicada por Ortega e cols.[199], abordando o papel da quinase dependente de ciclina D, especialmente o papel da CDK4 na fase G1 do ciclo, sua regulação pelos inibidores INK4 e desenvolvimento de tumores. A atividade da CDK6 também foi comentada, bem como, a rota INK4/CDK4 como alvo para terapêutica.

Outros autores interessados na concordância entre observadores no diagnóstico das lesões cervicais desenvolveram um estudo comparando o índice kappa entre patologistas na avaliação de lâminas coradas através da técnica de hematoxilina-eosina (kapa 0.60), bem como, pela imuno-histoquímica para p16<sup>INK4A</sup> (kapa 0.91). Foi constatada uma redução na discordância de

interpretação interobservadores pelo uso na rotina da p16<sup>INK4a</sup> na detecção das lesões de alto grau, bem como, nos casos de NIC I associados com a infecção por tipos virais de alto risco [216].

Também em 2002, alguns trabalhos pioneiros foram desenvolvidos detectando este marcador em lâminas de esfregaços vaginais, sendo que, Bibbo, M e cols. [217] propõem como procedimento de detecção do antígeno, o material colhido no meio líquido, com boa concordância na expressão da p16<sup>INK4A</sup> em citologia, com relação à histologia.

A expressão da p16<sup>INK4A</sup> através da imuno-histoquímica pode ser analisada no núcleo e no citoplasma das células e produz padrões de coloração definidos; de forma focal ou difusa, conforme exemplificam as figuras 13 e 14.

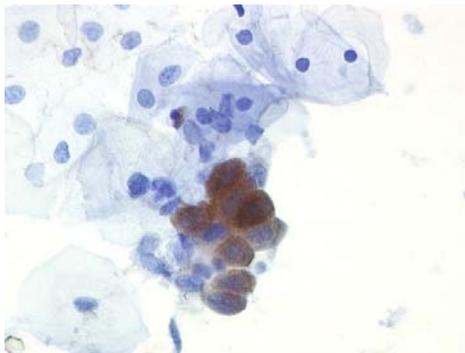


Figura 13: **Expressão forte e focal da p16<sup>INK4A</sup> em lâmina de citologia (nuclear e citoplasmática)**

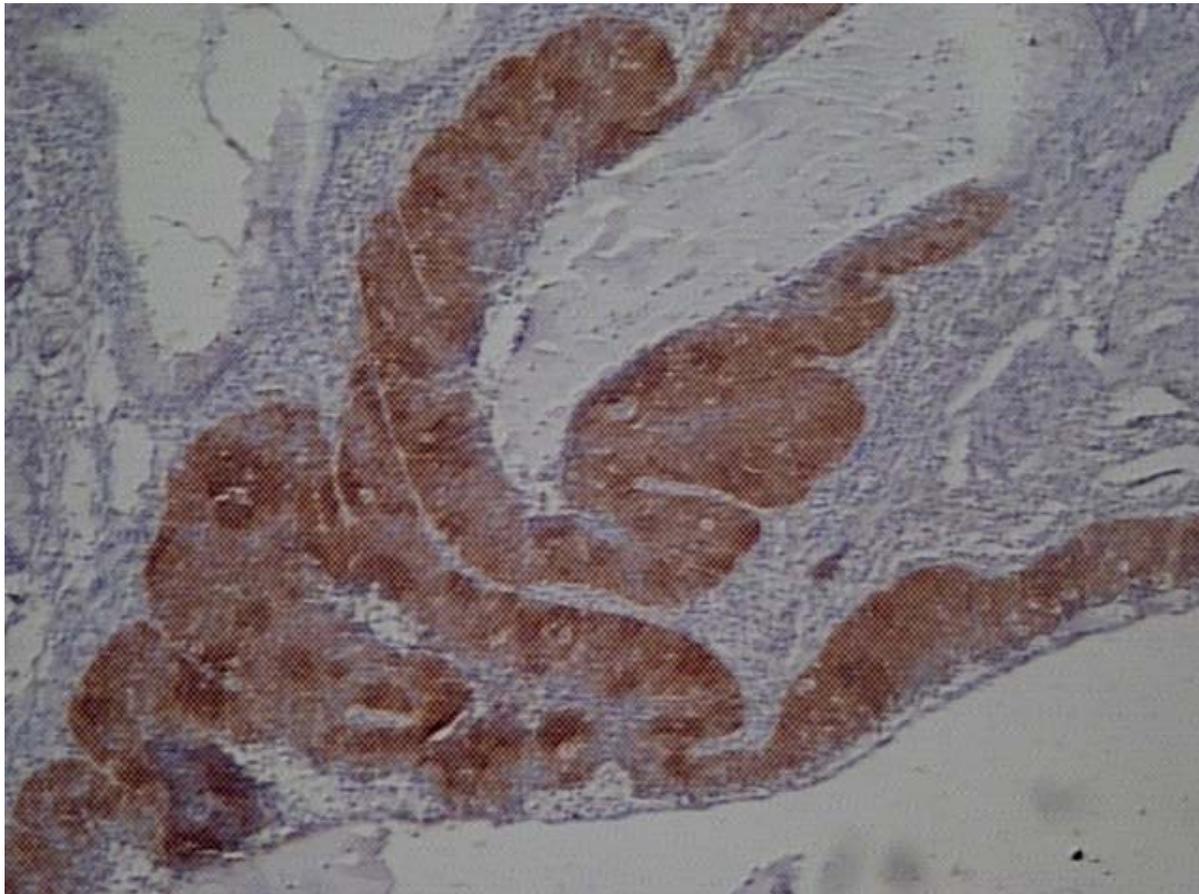


Figura 14: **Expressão forte e difusa da p16<sup>INK4a</sup> (100x) em corte histológico de colo uterino com HSIL.**

Agoff e cols. (2003) [140], verificaram a expressão da p16<sup>INK4A</sup> e de Ki67, em estudo de biópsias cervicais. A expressão da p16<sup>INK4a</sup>, bem como, a expressão de Ki67, correlacionaram-se significativamente ( $p < 0.001$ ) com a presença de HPV de alto risco e com o grau da neoplasia cervical.

Masumoto e cols. (2003) [202] estudaram a relação da expressão da p16<sup>INK4a</sup> com dez casos de carcinoma de células pequenas, um tumor mais raro e mais agressivo do que o tumor de células escamosas. Dos casos estudados, todos eram positivos para o vírus, nove eram do tipo

HPV-18. Destes, cinco apresentavam a forma integrada do vírus, o que corroborou ainda mais, com a elevada expressão da proteína.

Empregando esta mesma técnica, Yoshida e cols.(2004) [218], verificaram que a detecção da proteína p16<sup>INK4a</sup>, por imuno-histoquímica é mais sensível e específica no diagnóstico de lesões cervicais ativas, do que a detecção do tipo de HPV envolvido, empregando a citologia de base líquida. Concluíram também, que a expressão de p16<sup>INK4A</sup> deve ser utilizada como marcador no rastreamento inicial para citologia cervical.

Também neste ano, Kanao e cols. (2004) [13], estudaram a correlação entre dois genes supressores tumorais codificados pelo locus CDKN2A, cromossomo 9p21, p14<sup>ARF</sup>/p16<sup>INKA</sup> em câncer cervical de pacientes HPV positivas, os quais atuam sobre a p53 e RB, respectivamente. Encontraram uma correlação estatisticamente significativa ( $p < 0.03$ ), concluindo que ambos os genes apresentam-se superexpressos em câncer cervical de pacientes HPV positivas como consequência da ação das oncoproteínas E6 e E7 que inibem a ação dos genes supressores. Entretanto reforçam a necessidade de esclarecer quatro casos de câncer cervical que apresentaram diferentes padrões de expressão nestes marcadores, sendo dois casos com reduzida expressão dos dois genes, um caso com aumento de expressão de p14<sup>ARF</sup> e outro com aumento de p16<sup>INK4A</sup>.

Nieh e cols.(2005) [219] realizaram estudo com objetivo de comparar o teste DNA-HPV com a expressão da p16<sup>INK4A</sup> em lâminas contendo células atípicas de significado indeterminado (ASC-US) e no seguimento das pacientes que necessitaram biópsia. Encontraram uma forte expressão da p16<sup>INK4a</sup> nos casos de HSIL, como também, naquelas lâminas contendo ASC-US com lesões que necessitaram ser biopsiadas. Concluíram que a expressão da p16<sup>INK4a</sup> não só, pode indicar atividade patogênica de HPV de alto risco para esclarecer lâminas categorizadas como ASC-US, como também, a visualização direta do padrão e da intensidade de expressão,

parece ser até mais eficaz do que a detecção do tipo viral associado, na identificação de modificações celulares reativas.

Estudos recentes [220-222] têm confirmado a importância de utilizar a imunohistoquímica para a detecção da p16<sup>INK4a</sup> como teste complementar, com intuito de aumentar a sensibilidade do rastreamento citológico, bem como a especificidade do teste DNA-HPV para estabelecer e confirmar o valor prognóstico deste marcador em tumores ginecológicos, sejam eles, cervicais, glandulares, ovarianos ou outro.

Em estudo realizado em 2006, Benévolo e cols. [223], investigaram paralelamente a expressão de p16<sup>INK4a</sup> e o DNA-HPV em 100 biópsias (17 normais, 54 casos de NIC 1, 10 casos de NIC 2, 11 casos de NIC 3 e 8 casos de carcinoma invasor. Os resultados demonstraram que nenhum dos tecidos normais avaliados por imunohistoquímica, expressaram a proteína, enquanto que, os casos de NIC 1, NIC 2, NIC 3 e carcinoma invasor, expressaram, 31,0%, 90,0% e 100,0% para NIC 3 e carcinoma invasor, respectivamente, em constante crescimento ( $p < 0,001$ ).

Foram evidenciadas também neste estudo, uma elevada sensibilidade (84,0%) e especificidade (98,0%), em detectar casos de HPV de alto grau, com elevado valor preditivo positivo (VPP) de 97,0% e valor preditivo negativo (VPN) de 86,0%. Outro dado interessante, é que 93,0% das pacientes com NIC1 e p16<sup>INK4a</sup> positivas, eram portadoras de infecção por HPV de alto grau.

O padrão de expressão em células escamosas e glandulares displásicas, em lâminas de secreção vaginal e em tecidos, têm sido investigados extensivamente. Tecido epitelial normal, metaplásico, inflamatório, reativo e endocervical não exibem expressão de p16<sup>INK4A</sup>, nem no

epitélio normal adjacente à lesão. Em tecido displásico, a p16<sup>INK4A</sup> identifica a alteração com sensibilidade de 99,9% e especificidade de 100,0% [224].

Relacionando a expressão de p16<sup>INK4a</sup> como um marcador de severidade, trabalho recente de Albrecht e cols. (2007) verificaram uma forte e difusa expressão deste marcador em paciente de 70 anos portadora de HPV83 (HPV de grau intermediário) com citologia de NIC III. Análise molecular do peptídeo E6 verificou mutações características de inibição da atividade da p53, um gene supressor tumoral.

A expressão de p16<sup>INK4a</sup>, também tem sido estudada em outros tipos de neoplasias. Em tumores de mama, a presença aberrante no citoplasma foi observada em estudo prospectivo de 368 tumores invasivos, em 52 tumores não-invasivos, assim como, em 88 tumores recorrentes localizados e em três linhagens celulares. Esta intensa expressão é característica do pequeno grau de diferenciação, perda dos receptores de estrogênio e progesterona e uma intensa manifestação da proteína p53. Neste estudo [225] também foi observada uma elevada atividade proliferativa, através da expressão do anticorpo nuclear Ki67.

Milde-Langosch e cols. (2001) [226] verificaram a expressão da p16<sup>INK4a</sup> em tumores de mama, empregando o método Western-blot seguido de densitometria e, através da técnica de imuno-histoquímica. Observaram maior positividade de expressão utilizando o segundo método como diagnóstico e esta, foi indicativa de um fenótipo maligno mais intenso.

Jung e cols. (2005) [227], identificaram em 13 biópsias de carcinoma de células escamosas de conjuntiva, a expressão de alguns marcadores do ciclo celular, tais como: KI67, p16, p53 e p63. Constataram que a expressão da p53 e p63 foi consideravelmente maior ( $p < 0.01$ ).

No Brasil, estudos que investigam a p16<sup>INK4a</sup> são recentes [5, 70, 228].

Em pesquisa realizada na cidade de Ribeirão Preto em 2005, por Guimarães e cols. [228] foi avaliada a expressão de bcl-2 e p16<sup>INK4a</sup> em 65 biópsias cervicais HPV positivas como marcadores prognósticos de evolução das lesões intraepiteliais escamosas (SIL). Estratificaram em dois grupos, de acordo com a 2ª biópsia: 27 se mantiveram com diagnóstico de lesão de baixo grau (LSIL) e 38 progrediram para lesão de alto grau.(HSIL). No grupo com LSIL na 2ª biópsia, não foi encontrada associação entre a p16<sup>INK4a</sup> e bcl-2 e a presença de HPV 16 ou HPV 18. No grupo em que a lesão evoluiu, observou-se associação significativa entre a expressão da p16<sup>INK4a</sup> e a presença de HPV 16 ou HPV 18 ( $p < 0,02$ ), mas não com a expressão de bcl-2. Concluíram que a imuno-histoquímica para bcl-2 não é útil para prever a progressão de pacientes HPV positivas com lesão intraepitelial. Ao contrário, a p16<sup>INK4a</sup> parece estar associada aos tipos virais mais agressores, sendo um bom marcador para prever a progressão.

Também em 2005, Longatto e cols. [70] estudaram a expressão de p16<sup>INK4a</sup> associada ao antígeno de proliferação nuclear Ki67, em pacientes com diagnóstico citológico negativo, ou com diagnóstico de ASC-US, negativas para o HPV. Os autores sugerem que pacientes positivas para DNA-HPV de alto risco, com diagnóstico de ASC-US e positivas para p16<sup>INK4a</sup> e Ki67, devam ser cuidadosamente acompanhadas. Estes dois marcadores, juntos, parecem ser úteis no manejo diagnóstico das pacientes.

Outro estudo conduzido no Brasil por Lambert e cols.(2006) [5], em 54 mulheres com resultados histológicos de LSIL, 06 casos, HSIL, 21 casos e carcinoma, 27 casos (sendo destes, 23 de carcinoma escamoso e 4 de adenocarcinoma), foi observada uma maior frequência de HPV 16, sendo que destas, 59,1% tinham diagnóstico de câncer. A expressão da p16<sup>INK4a</sup> foi observada em 4/6 LSIL (66,0%), 18/21 (85,7%) de HSIL e em 27/27 (100,0%) casos de câncer, sugerindo uma boa correlação entre o grau da lesão e a expressão do marcador. Observaram também, uma

expressão elevada de p16<sup>INK4A</sup> em 5% das lesões HPV negativas, e ponderam que, a expressão da proteína nestes casos, foi resultado da inativação de Rb, HPV-independente. Entretanto, sugerem que novos estudos devem ser realizados para confirmar os resultados..

Análise realizada em 2006, Queiroz e cols. [229] relacionaram a expressão da p16<sup>INK4a</sup> em tecido cervical normal, lesões pré-neoplásicas e neoplásicas com a infecção pelo vírus do HPV e com a presença do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Detectaram a presença do DNA-HPV em pacientes HIV positivas independente do grau histológico, mas crescendo com a severidade da doença, nas pacientes HIV-negativas. Não foi observada nenhuma diferença na expressão da p16<sup>INK4a</sup> em relação à infecção simultânea de tipos virais na amostra. Os autores reforçam a importância da expressão da p16<sup>INK4a</sup> nos casos de NIC1, já que estes, têm regressão espontânea e, em 70,0% dos casos não necessitam tratamento. Estas lesões têm, muitas vezes discrepâncias diagnósticas intra e inter observadores, podendo ser útil, a investigação de um marcador mais sensível e específico, nestes casos.

#### 4. RELEVÂNCIA:

O câncer cervical ocorre, mais freqüentemente, em países em desenvolvimento como o Brasil, por motivos que incluem a carência na organização de rastreamento, falta de conscientização das mulheres, hábitos e educação inadequados, desnutrição e o difícil acesso à atenção médico-social.

A presença do Papilomavírus humano (HPV) de alto risco tem sido relacionada como fator importante e decisivo nas lesões cervicais precursoras e no desenvolvimento de câncer cervical [169]. Isto se deve, como já demonstrado, à presença dos oncogenes E6 e E7 codificadas no genoma viral, que interferem no mecanismo de multiplicação celular, caracterizando instabilidade genética [179]. Além disto, a persistência viral causada por alguns tipos mais agressivos, aliada a resultados falso-negativos, reforçam a permanência e o agravamento da infecção.

Assim, a infecção viral é essencial, mas não é suficiente para causar o câncer cervical. Em vista deste fato, é de extrema importância a avaliação de fatores epidemiológicos que definam o perfil das mulheres portadoras da infecção; como, comportamento sexual, paridade, uso de medicamentos, fumo, infecções prévias e outros.

A citologia é um método diagnóstico simples, de baixo custo, com boa especificidade e razoável sensibilidade. Entretanto, a possibilidade de resultados falso-negativos pode ter causas importantes, como o local inadequado para coleta, a má fixação do material, a falta de orientação prévia para uma coleta eficiente e o treinamento técnico deficiente.

Portanto, o estudo de marcadores promissores do ciclo celular, como a p16<sup>INK4a</sup>, ou de indicadores de proliferação como o antígeno nuclear Ki67, através da técnica de imunohistoquímica, podem proporcionar uma opção eficiente para confirmar resultados até então,

indefinidos. Além disto, a pesquisa e detecção de dados epidemiológicos, que representem hábitos de nossa população, que possam facilitar e acelerar a evolução de lesões precursoras é sem dúvida, uma contribuição importante em nosso meio.

## 5. OBJETIVOS:

### GERAL:

- Verificar a expressão de marcadores imuno-histoquímicos em cérvix uterina em uma amostra de mulheres assintomáticas, submetidas à biópsia de colo uterino em Porto Alegre, RS.

### ESPECÍFICOS:

- Verificar a presença da proteína p16<sup>INK4a</sup> em lesões cervicais de mulheres assintomáticas submetidas à biópsia de colo de útero;
- Verificar a associação da proteína p16<sup>INK4</sup> com características clínicas de infecção pelo HPV, com tipo específico de HPV e com características epidemiológicas da população estudada (idade, comportamento sexual, variáveis reprodutivas, escolaridade, dieta e outros);
- Verificar a expressão do marcador de proliferação celular Ki67 e de receptores hormonais (estrógeno e progesterona) nestas pacientes.

## **6. CONSIDERAÇÕES ACERCA DOS RESULTADOS APRESENTADOS NESTA TESE DE DOUTORADO**

Os dados aqui apresentados originaram-se de um estudo de coorte envolvendo mulheres que buscam atendimento em um Posto de Saúde da zona Norte de Porto Alegre-Posto Jardim Leopoldina, pertencente ao Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre-RS, conforme fluxograma apresentado (Anexo I). Este estudo teve início no final de fevereiro de 2003 e atualmente encontra-se em fase de análise dos dados.

Estas informações foram obtidas após aprovação do Projeto de **Pesquisa “Infecção pelo Papilomavírus Humano – HPV e alterações no gene P16 em câncer de cérvix uterina. Relação com Aspectos Clínicos e Epidemiológicos”** o qual estava vinculado a um projeto-chave denominado: **“A distribuição de Papilomavírus Humano oncogênicos e sua associação com lesões do colo cervical”**, coordenados pela Dra Mary Clarisse Bozzetti. Ambos os projetos foram aprovados pelos comitês de ética do hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA (anexo II) e do Hospital Conceição (anexo III).

Desde o início do estudo em fevereiro de 2003 até dezembro de 2006, foram arroladas nesta pesquisa, 1500 mulheres que realizaram o exame preventivo do câncer do colo uterino, não haviam sido hysterectomizadas e que relataram serem sexualmente ativas, sendo estes, os critérios de inclusão do estudo.

Todas as mulheres que eram convidadas a participar e aceitavam, assinavam um termo de consentimento informado (anexo IV), aprovado pelos comitês de ética de ambos os hospitais, no qual eram esclarecidos os objetivos do estudo, sua importância, os benefícios e prejuízos que por ventura as mesmas pudessem sofrer.

Após o aceite da paciente, era aplicado um questionário através do qual foram colhidos dados epidemiológicos, realização prévia de exame citológico, presença de outras patologias, etc. (Anexo V).

A paciente era convidada a prestar exame ginecológico com coleta de secreção vaginal para exame citológico e pesquisa de DNA-HPV. Apresentando alterações citológicas e/ou positividade para DNA-HPV, este era testado para tipos oncogênicos HPV-16, -18 e -31 e a paciente era encaminhada à realização de exame colposcópico. Na presença de alterações colposcópicas, a paciente era biopsiada e o fragmento de biópsia examinado histomorfologicamente e testado, por imuno-histoquímica, para os marcadores p16<sup>INK4a</sup>, Ki67, receptores de estrogênio e de progesterona, os quais fazem parte dos resultados aqui apresentados.

**Artigo 1: EXPRESSÃO DE p16<sup>INK4a</sup>, Ki67, E RECEPTORES HORMONAIS: RELAÇÃO COM PAPILOMAVÍRUS HUMANO E CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS.**

Mylius, L.C.M<sup>1,2</sup>., Edelweiss, M.I.A.<sup>1,4</sup>, Meurer, L<sup>4</sup>., Igansi, C.N.<sup>3</sup>; Medeiros, L<sup>3</sup> & Bozetti, MC<sup>1,3</sup>

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, 2.Faculdade de Farmácia, 3. Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, 4. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Fonte Financiadora: Fipe, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS- Brazil**

**GYNECOL ONCOL**

**Resumo:**

A expressão de marcadores do ciclo celular pode auxiliar na identificação e na caracterização de lesões cervicais. O objetivo deste estudo foi verificar a frequência de infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) e a expressão de p16<sup>INK4A</sup>, antígeno nuclear Ki67, receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP), em 89 biópsias de colo uterino. A presença de DNA-HPV foi identificada em 83,0% das biópsias, sendo que 46,0% destas eram portadoras de HPVVAR (alto risco) 16, 18 e/ou 31. Quanto ao anatomopatológico (AP), 7,0% eram lesões de alto grau, 59,0% de baixo grau e em 34,0% não foram observadas alterações. A expressão de p16<sup>INK4a</sup> foi observada em 85,3% das mulheres positivas para HPV-DNA-AR e esta associação foi significativa ( $p=0,02$ ), sendo que 100,0% eram positivas para HPV-16 ( $p=0,01$ ). A associação entre a expressão de p16<sup>INK4a</sup> e HPV-DNA foi significativa entre fumantes ( $p=0,03$ ), com história

prévia de DST ( $p=0,01$ ) e com sexarca entre 17-19 anos ( $p=0,04$ ; OR: 8,500 IC95% 0,971-74,424), três ou mais parceiros sexuais ao longo da vida ( $p=0,02$ ). O Ki67 foi expresso em 100,0%, 31,0% e 32,0% das lesões de alto grau e baixo grau e das biópsias sem alterações ( $p<0,003$ ). Não foi observada associação significativa entre a expressão do RE e os desfechos estudados. O RP foi expresso em 42,0% e, 26,5% eram positivas para HPV-AR. ( $p=0,023$ ). A expressão do RP foi maior em não-fumantes ( $p=0,02$ ), nas que utilizavam anticoncepcional oral ( $p=0,03$ ) e que tinham menor escolaridade ( $p=0,04$ ). A associação dos aspectos epidemiológicos com a expressão de p16<sup>INK4a</sup> e de Ki67 parece ser de grande relevância no diagnóstico e acompanhamento de lesões potencialmente ativas.

## **I. INTRODUÇÃO**

O câncer cervical é um importante problema de saúde pública que acomete mulheres no mundo inteiro (cerca de 471.000 casos novos), sendo no Brasil, a terceira causa de morte por neoplasias, precedido pelos tumores de pele e de mama [1, 2].

Embora apresente elevada taxa de cura, já que seu período de latência é longo e, se detectado precocemente, o tratamento é efetivo; a prevalência elevada sugere que um grande número de mulheres parece ignorar o problema ou não tem acesso aos programas de rastreamento [1].

Os programas de rastreamento, baseados na avaliação das amostras citológicas têm reduzido a incidência e as taxas de mortalidade. No entanto, uma única avaliação citológica é pouco sensível, principalmente em virtude da coleta que, muitas vezes, abrange áreas não representativas ou tem uma interpretação equivocada. Além disso, algumas alterações precoces, podem não ser facilmente detectáveis, apresentando limitações com relação à sensibilidade e especificidade[3]. As taxas de falso-negativos variam de 15 a 50,0% e de resultados falso-positivos chegam a 30,0% [4, 5].

Este fato reforça a necessidade de estabelecer novos marcadores para detectar alterações em células epiteliais que possam auxiliar no diagnóstico, no prognóstico e na monitoração de tratamentos.

O Papilomavírus humano (HPV) está fortemente associado ao câncer cervical. Dos mais de 100 tipos identificados, classificados em alto e baixo risco, aproximadamente 40 podem ser causa de neoplasias do trato urogenital [6, 7].

Sabe-se que, o genoma viral permanece extra-cromossomal em infecções benignas e, quando integrado ao DNA do hospedeiro, provoca uma quebra na região E2 do vírus e uma

superexpressão das oncoproteínas E6 e E7, causando infecção persistente e progressão neoplásica. Estas oncoproteínas interagem com proteínas que regulam o ciclo celular e causam a inativação de genes supressores tumorais [8-11].

A oncoproteína E6 induz uma degradação prematura da proteína supressora tumoral p53 através da rota da ubiquitina. A oncoproteína E7 se liga à proteína supressora tumoral pRb, a qual normalmente inibe a progressão do ciclo celular até a fase S, complexando-se ao fator de transcrição E2F [10]. A oncoproteína E7 do HPV interage e neutraliza a função de proteínas semelhantes à Rb, p107 e p130. Esta interação, análoga a da quinase dependente de ciclina, possibilita a fosforilação, induz a degradação de pRB, resultando na liberação do fator de transcrição E2F. Desta forma, estimula a célula infectada a entrar na fase S do ciclo celular, provocando aumento na concentração do inibidor da quinase dependente de ciclina, p16<sup>INK4A</sup> [12, 13]. A indução desta proteína se dá durante a imortalização nas lesões pré-neoplásicas, um evento precoce que resulta na gênese tumoral [12].

Estudos tem demonstrado uma super-expressão da p16<sup>INK4a</sup> em lesões HPV positivas e ressaltam a importância deste marcador na detecção de lesões pré-neoplásico e neoplásico da cérvix uterina, entretanto a negatividade para p16<sup>INK4a</sup> não é suficiente para excluir pacientes do grupo de risco [14-18].

Células em proliferação expressam em seu núcleo uma proteína não-histona, com meia-vida curta, denominada Ki-67 ou MIB-1 e, o anticorpo monoclonal Ki-67 detecta o antígeno nuclear que é expresso em todas as fases do ciclo celular (G1,S,G2,M), exceto na fase G0 [19-23].

A expressão imuno-histoquímica do Ki67 tem mostrado a relação entre a intensidade de expressão do mesmo, o grau histológico e o comportamento do tumor, sugerindo que a sua

intensidade é um marcador útil no prognóstico de lesões em doenças de tecidos moles, em doenças linfoproliferativas e, em alguns carcinomas menos diferenciados e com alto índice mitótico [20]. Tem valor no diagnóstico como marcador de proliferação, principalmente em patologias ginecológicas, sendo que lesões cervicais escamosas aumentam o índice de proliferação desde camada basal do epitélio normal até em casos de Neoplasia epitelial cervical grau 3 (NIC 3)[20].

O desequilíbrio entre a proliferação causada pelo vírus e apoptose, parece não ser suficiente para o desenvolvimento do câncer cervical invasivo. A exposição a vários co-fatores incluindo hormônios esteróides e progesterona pode contribuir para o desenvolvimento desta doença [24-26].

A presença de receptores de estrogênio e progesterona na cérvix e nas lesões causadas pelo HPV sugere que o epitélio cervical deva responder aos hormônios exógenos e que estes contribuem para o desenvolvimento das lesões, podendo levar ao carcinoma cervical [27].

O efeito do estrogênio tem sido associado à rota específica do metabolismo hormonal oxidativo. Portanto, a infecção pelo HPV pode facilitar a formação de metabólitos de estrogênio potencialmente carcinogênicos [28].

A reposição hormonal ou o emprego de anticoncepcionais orais tem sido usado por muitas mulheres nos dias atuais e, poucos estudos têm se preocupado em esclarecer a associação destes fatores com a infecção genital pelo HPV e suas conseqüências.

Este estudo verificou a expressão imuno-histoquímica de p16<sup>INK4A</sup>, antígeno nuclear Ki67, receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP), em biópsias de colo uterino de pacientes com lesão cervical, portadoras ou não de DNA-HPV e ou DNA-HPV-AR..

### **Material e Métodos:**

Entre fevereiro de 2003 e janeiro de 2006 foi conduzido um estudo transversal para verificar a prevalência de infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) envolvendo mulheres assintomáticas que buscavam atendimento em Unidade de Atenção Primária em Porto Alegre-RS, Brasil.

Fizeram parte desta análise, as participantes que realizaram biópsia do colo uterino, perfazendo um total de 89 mulheres. Todas as participantes assinaram termo de consentimento informado e responderam a um questionário epidemiológico padronizado sobre as características demográficas, hábitos pregressos, história reprodutiva e comportamento sexual.

### **Imuno-Histoquímica:**

Cortes de biópsias (4µm de espessura) embebidas em parafina e fixadas em formalina (representativas da lesão) foram submetidas a técnica de imuno-histoquímica empregado na rotina do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS- Brasil, descrito por Mills em 1992 e Santos e colaboradores em 1999 [29, 30], o qual consiste nas seguintes etapas: desparafinização e rehidratação, recuperação antigênica, inativação da peroxidase endógena e bloqueio de reações inespecíficas. O anticorpo primário foi incubado por 12 hs a 4°C, conforme diluição padronizada pelo fornecedor, seguido da aplicação do complexo-estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako), revelação com diaminobenzidina tetrahydroclorido (Kit DAB, Dako) e contrastado com hematoxilina. A descrição dos reagentes e diluições encontra-se no Quadro 1.

Para a detecção de p16<sup>INK4a</sup>, foi utilizado como controle positivo, lâmina corada com lesão intraepitelial de alto grau, sabidamente positiva para HPV. Como controle negativo, lâmina sem o anticorpo primário.

A reação apresentou como controle positivo para Ki67, corte contendo um linfonodo com hiperplasia reacional, sendo o controle negativo realizado no mesmo tipo de amostra sem o anticorpo primário.

Controles negativo e positivo para receptores hormonais (estrogênio e progesterona) foram empregados. Em todos os casos, de 100 a 200 células foram contadas e, os resultados foram expressos em percentual.

**Quadro 1: Descrição dos reagentes empregados**

<b>Antígeno Fonte</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Diluição</b>
Gene P16 Neomarkers,CA,USA	P16 <sup>INK4a</sup>	16P07	1:75
Ki67 DAKO,Glostrup, Denmark	Anti-Ki67	MIB-1	1:30
RE DAKO Cytomation	Anti- ER alfa	1D5	1:50
RP DAKO,Glostrup, Denmark	Anti PR	PgR636	1:50

RE- Receptor de Estrogênio

RP- Receptor de Progesterona

Duas patologistas (MIE e LM) foram cegadas para informações histopatológicas e clínicas para análise das lâminas O resultado final foi obtido pelo consenso entre os dois profissionais.

**Interpretação de p16<sup>INK4a</sup>, Ki67, Receptores de Estrogênio e Progesterona:**

Ambas as colorações, citoplasmática e nuclear, foram consideradas positivas para as células que expressaram p16<sup>INK4a</sup>. A intensidade de expressão para p16<sup>INK4a</sup> nas neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) foi graduada como: negativo (-) se nenhuma das células expressaram coloração, positivo (+) se o percentual de células que expressaram variou de 1-25,0%, positivo(++) se o percentual variou de 26-75,0% e positivo (+++) se mais de 75,0% das células foram coradas [31]. O padrão de expressão das células foi dividido em focal se a expressão estava concentrada em algumas áreas e difuso se a expressão estava distribuída por toda a lâmina.

Ki67 foi considerado positivo somente se o núcleo das células estava corado e determinou-se o percentual de células que o expressavam.

Para detectar os receptores de estrogênio e progesterona, a coloração foi dividida em 4 escalas de zero a 3 cruces, de acordo com o percentual e intensidade de coloração nuclear no epitélio, tecido normal e epitélio displásico (NIC 1, NIC 2 e NIC 3).

#### **Extração do DNA e Análise do HPV:**

Amostras citológicas foram coletadas para a realização do exame citopatológico convencional e para o teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O material coletado em meio líquido foi estocado a -20°C até a extração do DNA pela técnica de PCR.

As amostras foram centrifugadas a 7000 rpm por 10 minutos, ressuspensas e, digeridas em 200 µg/ml de proteinase K (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) e incubadas por 18h a 37°C. O DNA foi submetido a 94°C por 10 minutos para inativação da proteinase e o mesmo foi usado na reação de PCR. A amplificação foi direcionada para o gene L1 e os primers empregados foram MY09 (5'-CGT CC<sup>A</sup>/<sub>C</sub> AA<sup>A</sup>/<sub>G</sub> GGA <sup>A</sup>/<sub>T</sub>AC TGA TC-3') e MY11 (5'-GC<sup>A</sup>/<sub>C</sub> CAG GG<sup>A</sup>/<sub>T</sub> CAT AA<sup>C</sup>/<sub>T</sub> AAT GG -3'). As condições de estudo da PCR foram descritas por

Bauer et al (1993) [32] e Coutlée et al (2002) [33]. Para o controle da reação de PCR, primers de beta-globina foram desenvolvidos e testados em todas as amostras.

### **Pesquisa dos tipos oncogênicos mais freqüentes**

Todas as amostras positivas na triagem DNA-HPV foram tipadas para AR (HPV-16, -18 e -31), utilizando-se primers específicos correspondentes à região E6 e E7 do genoma viral. As condições de amplificação e os primers utilizados estão baseados na metodologia descrita por Cuzick et al (1994) [34] (Quadro 2):

Quadro 2: Condições de Amplificação e *Primers* Utilizados

<b>Tipos Virais</b>	<b>Seqüência</b>	<b>Ta<sup>a</sup> (°C)</b>
<b>HPV-16</b>	5'...GC GAT CCT GTC TGC TTT TAT ACT AA...3' (sense)	54°C
	5'...AAG GCC AAC TAA ATG TCA C...3' (antisense)	
<b>HPV-18</b>	5'...TGC AGC ACG AAT GGC ACTGGC CTG...3' (sense)	70°C
	5'...CAC GGC GAC CCT ACA AGC TAC CTG...3' (antisense)	
<b>HPV-31</b>	31A 5'...TACCTGTGTTTCTGTTAAC...3' (sense)	52 °C
	31S 5'...AGAAAGACCTCGGAAATTG...3' (antissense)	

<sup>a</sup>**Temperatura de Anelamento**

Para o controle das reações, foi ensaiado para cada PCR de DNA de amostras clínicas, um controle positivo de reação, que consistiu em um fragmento de 450pb correspondente às células Caski e SiHa (células infectadas com o vírus HPV) e um controle negativo de reação sem a presença de qualquer DNA. Em todas as amostras clínicas foi realizado um PCR multiplex utilizando primers My09/My11(correspondente ao gene L1 do do genoma viral do HPV e

primers complementares ao gene da  $\beta$ -globina humana (gH20 e PC04) [32]. Os primers de  $\beta$ -globina foram empregados nestas reações para verificar a viabilidade do DNA testado.

O resultado do estudo anátomo-patológico foi categorizado e analisado como normal, LSIL (NIC I) e HSIL (NIC II, III e câncer invasor).

#### **Variáveis do Estudo:**

Os desfechos do estudo foram o diagnóstico histo-patológico das lesões do colo uterino, a pesquisa do HPV-DNA e dos tipos de alto risco (HPV-AR) 16,18 e 31. Os marcadores biológicos p16<sup>INK4a</sup>, Ki67 e Receptores de estrógeno e progesterona foram relacionados com estes desfechos. As variáveis independentes incluem os dados demográficos, de comportamentos sexuais, reprodutivos e morbidades pregressas.

#### **Controle de Qualidade dos Dados:**

Todas as informações foram armazenadas em um banco de dados com dupla digitação. Um total de 20,0% dos questionários foi selecionado aleatoriamente e conferidos com os originais para verificar possíveis erros e incongruências.

#### **Análise Estatística:**

Os dados foram analisados utilizando o teste Qui-quadrado de Pearson e Mantel-Hansel na estratificação para os potenciais variáveis de confusão. A razão de chance (OR) com seu respectivo intervalo de confiança de 95,0% foi estimada para cada variável. O valor de  $p$  para significância estatística foi  $\leq 0,05$ .

#### **Considerações Éticas:**

Este protocolo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (Nº 112/2002) e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Nº 03-083). Todas as participantes assinaram termo de consentimento informado.

### **Resultados:**

Um total de 89 mulheres realizou biópsia de colo uterino e foram incluídas neste estudo. Na tabela 1 estão descritas as características demográficas das pacientes estudadas. Observa-se que a maioria (57,3%) tinha 35 anos ou mais, era caucasianas (83,2%), sendo que 43,8% iniciaram vida sexual aos 17 anos ou mais jovens e 46,1% tiveram pelo menos três parceiros sexuais ao longo da vida. Em torno de 75,0% utilizavam anticoncepcional oral (ACO), 25,0% eram fumantes e 68,0% tinham história prévia de doença sexualmente transmissível (DST).

**Tabela 1: Características demográficas da população estudada (n=89).**

<b>Características das variáveis</b>	<b>N (%)</b>
<b>Idade (em anos)</b>	
< 35	38 (42,7)
≥ 35	51 (57,3)
<b>Estado marital</b>	
Casada	45 (50,6)
Não casada	44 (49,4)
<b>Escolaridade</b>	
Até o 1º grau incompleto	24 (27%)
1º grau completo ao 2º incompleto	26 (29,2%)
2º grau completo ou mais	39 (43,8%)
<b>Cor</b>	
Branca	74 (83,1%)
Não-branca	15 (16,9%)
<b>Menarca</b>	
<12 anos	27 (30,3)
≥12 anos	62 (69,7)
<b>Sexarca</b>	
≤ 17 anos	39 (43,8)
>17 à 19 anos	25 (28,1)
20 anos ou mais	25 (28,1)
<b>Nº parceiros na vida</b>	
Até 1 parceiro	29 (32,5)
2 parceiros	19 (21,3)
3 ou mais parceiros	41 (46,1)
<b>Número de filhos</b>	
≤ 3 filhos	51 (57,3)
> 3 filhos	38 (43,7)
<b>Idade 1ª gestação</b>	
≤ 17 anos	20 (22,5)
>17 anos	51 (57,3)
<b>Uso de Anticoncepcional Oral</b>	
Não	22 (24,7)
Sim	67 (75,3)
<b>Fumo</b>	
Não	67 (75,3)
Sim	22 (24,7)
<b>DST</b>	
Não	28 (31,5)
Sim	61 (68,5)
<b>Co-Infecção HPV e Chlamydia</b>	
Não	73 (82)
Sim	16 (18)

A presença de DNA-HPV foi identificada em 83,0% (74/89) das biópsias. Entre as mulheres HPV positivas, 46,0% (34/74) eram portadoras de HPV de alto risco (16, 18 ou 31).

No diagnóstico anatomopatológico (AP) observou-se lesões de alto grau (HSIL) em 7% das biópsias, e de baixo grau (LSIL) em 59,0%. Em 34,0% não foram observadas alterações ao AP.

A Tabela 2 mostra a distribuição dos resultados do AP de acordo com a presença ou não de DNA-HPV. Todos os casos de HSIL, 88,0% dos LSIL e 72,0% dos normais eram HPV positivos ( $p=0,08$ ).

**Tabela 2: Associação entre o resultado anátomo-patológico e DNA-HPV**

Anatomopatológico	N	HPV +	HPV-	$p^*$
Normal	32	23	09	
LSIL	51	45	06	0.08
HSIL	06	06	00	

\*  $p$  para o teste  $\chi^2$  de Pearson

Observou-se que 85,3% (29/34) das mulheres positivas para os HPV-DNA-AR testados expressaram a proteína p16<sup>INK4a</sup> e esta associação foi estatisticamente significativa ( $p=0,02$ ). Todas as biópsias, positivas para HPV-16 (16/34), expressaram a proteína p16<sup>INK4a</sup> ( $p=0,01$ ).

A análise da intensidade de expressão de p16<sup>INK4a</sup> sugere que, quanto mais grave a lesão, mais forte é a expressão da proteína. Houve uma associação estatisticamente significativa entre a intensidade de expressão forte (+++), moderada (++) , fraca (+) e o grau de lesão. Também se observou uma associação estatisticamente significativa entre o padrão de expressão de p16<sup>INK4a</sup> e o grau da lesão ( $p= 0,001$ ). O padrão difuso esteve presente em 100,0% das amostras cuja intensidade era forte, 76,0% dos casos com intensidade moderada e em 50,0% daquelas com intensidade fraca.

Entre as variáveis epidemiológicas estudadas algumas se mostraram associadas à presença de DNA-HPV e DNA-HPV-AR como também, relacionadas à expressão dos marcadores p16<sup>INK4a</sup>, Ki67 e o receptor de progesterona. Nenhuma das variáveis independentes modificou a associação entre a expressão de p16<sup>INK4a</sup> e o exame anátomopatológico, bem como, o receptor de estrogênio.

A associação entre a expressão de p16<sup>INK4a</sup> e HPV-DNA se mostrou estatisticamente significativa entre fumantes ( $p=0,03$ ; OR: 11,25 IC95%:1,11-114,4), entre mulheres com história prévia de DST ( $p=0,01$ ; OR: 6,82 IC95% 1,53-30,3), naquelas com sexarca entre 17 e 19 anos ( $p=0,048$ ; OR:8,500 IC95%: 0,971-74,424) e em mulheres com três ou mais parceiros sexuais ao longo da vida ( $p=0,02$ ; OR: 8,12 IC95%: 1,31-50,2). As variáveis, escolaridade e uso de anticoncepcional oral não modificaram a associação entre p16<sup>INK4a</sup> e HPV-DNA.

Quanto ao Ki67, observou-se à presença deste marcador nuclear em 100,0%, 31,0% e 32,0% das lesões de alto grau e baixo grau e dos fragmentos classificados como normais, ao anatomopatológico, respectivamente. Esta associação foi estatisticamente significativa ( $p=0,003$ ).

Nenhuma das variáveis estudadas interferiu na associação entre a expressão de Ki67 e a presença de HPV-DNA. No entanto, houve uma associação significativa entre este marcador e o exame anátomo-patológico, entre usuárias de anticoncepcional oral ( $p=0,005$ ; OR:3,9 IC95%:1,67-7,13), com história prévia de DST ( $p=0,04$ ; OR: 12,0 IC95%: 11,62-34,77) e as que tiveram pelo menos dois parceiros sexuais ao longo da vida ( $p=0,03$ ; OR: 2,6 IC95%: 1,5-5,7). Observou-se uma associação protetora naquelas mulheres que tiveram a sexarca com 20 anos ou mais ( $p=0,03$ ; OR:0,10 IC95%: 0,01-0,97).

Sendo Ki67 e p16<sup>INK4a</sup> marcadores de proliferação e de oncogenicidade, analisou-se a expressão de Ki67 em relação à quantidade de expressão de p16<sup>INK4a</sup>. Observa-se que 69,7% das biópsias com percentual maior de expressão de p16<sup>INK4a</sup> (>50,0% das células), expressavam também, o marcador de proliferação Ki67 ( $p=0,012$ ) (tabela 3).

**Tabela 3: Associação entre a expressão de Ki67 e p16<sup>INK4a</sup> nas biópsias cervicais**

Expressão de Ki67	Sem Expressão	N (%)			<i>p</i> *
		≥1 e ≤10	>10 e ≤50	>50	
<b>Positivo</b>	06 (23,1%)	0 (0%)	4 (25%)	3 (53,5%)	<b>0.012</b>
<b>Negativo</b>	20 ( 76,9%)	4 (100%)	12 (75%)	20 ( 46,5%)	

\* Valor de *p* para o teste  $\chi^2$  de Pearson

Não houve associação entre a presença ou não de HPV, independente de ser de alto risco, com a expressão do receptor de estrogênio ( $p>0,05$ ). Somente 18,0% (6/34) das mulheres com HPV de alto risco, expressaram este receptor. Em relação ao estroma, o comportamento foi semelhante, o receptor foi expresso em apenas 12,0% (4/34) dos casos e em 2,9% (1/34) do epitélio normal, não apresentando associação com HPV de alto risco.

Não foi observada associação estatisticamente significativa entre a expressão do receptor de estrogênio e os desfechos estudados.

O receptor de progesterona foi expresso em 42,0% (37/89) dos casos estudados. Entre as 37 biópsias positivas para o receptor de progesterona, 26,5% (9/37) eram positivas para os tipos virais de alto risco estudados ( $p=0,023$ ). Em relação ao estroma, o receptor foi expresso em 36,0% (32/89) das amostras.

Ao analisar-se a expressão do receptor de progesterona em relação às variáveis epidemiológicas, alguns aspectos merecem destaque. Entre as mulheres com pelo menos três

parceiros sexuais ao longo da vida, observou-se uma associação com significância limítrofe entre este receptor e a presença de HPV-DNA-AR ( $p < 0,06$ ).

A expressão do receptor de progesterona foi maior em não-fumantes ( $p = 0,02$ ), independente do tipo de HPV-DNA presente. Entre as mulheres que utilizavam anticoncepcional oral ( $p = 0,03$ ) e que tinham uma menor escolaridade ( $p = 0,04$ ) também foi observado uma maior expressão deste receptor.

### **Discussão:**

Neste estudo, determinou-se a expressão imuno-histoquímica dos marcadores celulares p16<sup>INK4a</sup>, Ki67, receptores de estrogênio e progesterona de pacientes biopsiadas por lesão do colo uterino portadoras ou não de HPV, bem como a associação destes marcadores com as variáveis epidemiológicas estudadas.

A importância da infecção persistente pelo HPV nas lesões cervicais em diferentes graus histológicos tem sido demonstrada em vários estudos [35-38]. A atividade transformadora do vírus está de acordo com sua capacidade de replicação e de diferenciação no epitélio após a sua integração. Os tipos virais de alto risco são agentes etiológicos essenciais do câncer cervical [39]

Enquanto a infecção é pré-requisito para o desenvolvimento do câncer cervical, somente pequena proporção das mulheres com infecção viral, desenvolve neoplasia. A variabilidade genética do hospedeiro e co-fatores ambientais, entre eles, o fumo, hormônios esteróides, fatores de comportamento sexuais e a presença de outros agentes infecciosos têm sido identificados nas diferentes etapas de evolução da patogênese cervical [40, 41].

Tem sido sugerido por alguns autores que a integração viral leva a um descontrole na expressão dos oncogenes E6 e E7, provocando proliferação celular desordenada. No entanto,

métodos que detectem estas alterações exigem metodologia sofisticada, o que muitas vezes, não é acessível na rotina [42]. A expressão de p16<sup>INK4a</sup>, um inibidor da quinase dependente de ciclina (CDK4/6-ciclina D) se dá devido à inibição de pRB (proteína do retinoblastoma), um gene supressor tumoral que é depletado pela oncoproteína E7 de HPV de alto risco. Este marcador tem sido citado em alguns estudos como promissor na detecção de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo uterino [43-45].

Neste estudo, a frequência de infecção pelo vírus do HPV nas biópsias cervicais foi de 83,0%, sendo que, 46% eram portadoras de HPV de alto risco. Observou-se uma associação de p16<sup>INK4a</sup> com a presença de HPV-DNA-AR. Estes achados corroboram os resultados de outros investigadores [9, 12, 37, 46-48]. Além disto, observou-se que todas as amostras positivas para HPV-16 expressaram esta proteína. Outros estudos também relatam maior expressão de p16<sup>INK4a</sup> em mulheres infectadas pelo HPV-16, demonstrando uma maior agressividade deste tipo viral. [10, 12, 37, 46].

Os diferentes graus histológicos encontrados neste estudo sugerem a presença da infecção, entretanto a integração cromossômica do DNA viral parece não estar presente na maioria dos casos, uma vez que grande parte das biópsias foi classificada como lesão de baixo grau. Uma vez integrado ao DNA, ocorre quebra no genoma entre as regiões E1 e E2, um descontrole da expressão dos oncogenes E6 e E7, causando proliferação celular, aumentando assim, o risco para lesões de alto grau [42].

Quanto à expressão de p16<sup>INK4a</sup>, os achados sugerem uma associação entre o aumento de expressão desta proteína e o agravamento da lesão. O tipo de lesão predominante neste estudo, LSIL (baixo grau) sugere uma lesão inicial. Normalmente nestes casos, as proteínas E6 e E7 não são capazes de induzir anormalidades no centróssomo ou defeitos mitóticos. Em muitos tumores,

anormalidades no centróssomo aparecem como consequência de citocinese, problemas na divisão celular que acontecem em células que acumulam também, anormalidades nucleares [49]. Esta poderia ser uma possível explicação para alguns dos achados observados no presente estudo.

Nas infecções por HPVs de baixo risco, as oncoproteínas E6 e E7, contribuem para o ciclo viral, no entanto, a atividade transformadora é baixa e não induz à instabilidade genética, representando baixa eficiência na desestabilização da ligação da oncoproteína E7 à pRB. Em relação a oncoproteína E6 de HPV de baixo risco, a interação à p53 também não ocorre de maneira eficiente, portanto, a degradação da mesma não é completa [49, 50].

Assim, infecções causadas por HPV de alto risco são um fator chave no desenvolvimento das neoplasias intraepiteliais cervicais, causando um descontrole na expressão dos oncogenes virais e na ligação da oncoproteína E7 a pRb, com liberação do fator de transcrição E2F [12].

A idade precoce da primeira relação sexual, o número de parceiros ao longo da vida, a história de doenças sexualmente transmissíveis, o uso de anticoncepcionais orais e fumo têm sido considerados co-fatores no desenvolvimento do câncer cervical em alguns estudos [51-54]. Os achados deste estudo sugerem uma maior expressão de p16<sup>INK4a</sup> nas mulheres com coitarca precoce e naquelas com mais parceiros sexuais na vida (três ou mais). Uma possível explicação seria que por iniciarem a vida sexual mais precocemente estas tendem a ter um número maior de parceiros, se tornam mais expostas e mais vulneráveis à infecção. Ressalta-se aqui também, a falta de acesso à conhecimentos sobre a patogenicidade de alguns agentes sexualmente transmissíveis, educação para saúde e a dependência de serviços públicos de saúde, às vezes, não tão eficientes [55]. Assim, aumentam a possibilidade de exposição a HPVs oncogênicos que por sua vez estimulam a proliferação celular, justificando a expressão de p16<sup>INK4a</sup> [52-54, 56, 57].

Torres et al. (2006) em seu estudo não verificou associação significativa entre a infecção viral e o número de parceiros, entretanto a sexarca precoce (abaixo de 17 anos) esteve associada, sugerindo a existência de um período de latência ao potencial oncogênico viral. Justifica-se também, ser a cérvix uterina mais vulnerável na menacme, quando o tecido sofre metaplasia, a infecção pode alcançar a camada basal e estabelecer uma infecção persistente [38].

Embora outros estudos tenham relatado associação destes fatores com a presença de infecção pelo HPV, não foi encontrado estudo que relacionasse a expressão de p16<sup>INK4a</sup> com estes achados.

Foi verificada neste estudo uma associação significativa da expressão de p16<sup>INK4a</sup> com a presença de HPV-DNA em fumantes. Em relação ao fumo, sabe-se que o mesmo pode facilitar a integração viral do HPV-18, bem como, diminuir a capacidade de apoptose para infecções causadas pelo HPV-16 justificando a maior expressão desta proteína. Além disto, constituintes do cigarro como a nicotina, cotidina e N-nitrosaminas tem sido detectados no muco cervical de fumantes, o que contribui com a formação de produtos tóxicos ao DNA celular [40]. Este achado corrobora os descritos por Lea et al. (2004) [58], onde os autores detectaram hipermetilação de p16<sup>INK4a</sup>, evento epigenético e sua superexpressão em fumantes portadoras de displasia de alto grau e carcinoma do colo uterino. Wright et al. (2005) [40] observaram que a presença de HPV 18 ou 45 está associada com menor tempo de sobrevida, principalmente quando relacionada ao uso do tabaco.

Em estudo conduzido por Rombaldi et al. (2006) [55] em homens portadores de infecção pelo HPV, não foi verificada associação com o fumo e comentam que a associação já demonstrada em mulheres poderia ser justificada pela imunidade local, diferenças estruturais do tecido epitelial feminino que favoreceria a infecção e, sua permanência.

Alguns agentes sexualmente transmissíveis têm sido associados à etiologia neoplásica, relacionados ou não à infecção pelo HPV, como *Chlamydia trachomatis* e *Trichomonas vaginalis* [59-64]. Este estudo sugere uma associação significativa entre a expressão de p16<sup>INK4a</sup> e a presença de DNA- HPV nas mulheres com história prévia de DST, o que pode sugerir uma maior exposição destas. Para Kanjanavirojkul et al. (2006) [65], possuir mais do que um parceiro, ter história de doença sexualmente transmissível e ser múltipara foram considerados importantes fatores de risco para a infecção viral e, conseqüentemente a carcinogênese.

A expressão de Ki67 vem sendo empregada em alguns estudos como ferramenta auxiliar no diagnóstico de lesões potencialmente ativas. No presente estudo, houve associação entre a expressão de Ki67 e a avaliação anatomopatológica das lesões, sendo esta mais expressa em lesões mais graves. Em relação ao Ki67, apesar das biópsias conterem DNA-HPV, a ausência ou a mínima expressão (<5%) não excluiu casos de lesão de baixo grau. Em contrapartida, em situações de epitélio normal ou metaplásico, a expressão do marcador pode também refletir a atividade do ciclo celular. Nestes casos, se verifica a baixa especificidade deste biomarcador em confirmar ou excluir lesões pré-invasivas [66].

Cabe salientar que o emprego de biomarcadores apresenta evidência de força, como também, de falhas diagnósticas. Este efeito pode ser verificado através da análise de expressão de Ki67 a qual se apresenta superexpressa nestas lesões [42].

Keating et al., em 2001 [66] verificaram uma forte associação entre o grau histológico e a expressão de Ki67. A expressão foi suprabasal em 18 dos 19 casos de HSIL. Um número significativo de casos de HSIL exibiu a coloração de Ki67 em toda a camada (12 dos 19 casos). A expressão de Ki67 nos 2/3 superiores do epitélio é um forte indicador de HSIL sendo menos evidente para os casos de LSIL, mesmo para variantes imaturas, demonstrando, nestes casos, um

menor efeito citopático viral. Observa-se variação também na intensidade de expressão quanto ao grau de lesão. Este dado foi confirmado por Sarian et al., 2006 [67].

Em estudo conduzido por Koyamatsu et al., 2003 [68] foi demonstrada a expressão de Ki67 e de p53 em carcinomas cervicais, vaginais e vulvares. A expressão de Ki67 foi verificada em 70% dos tumores cervicais, 75,5% dos vaginais e 67,7% do carcinomas vulvares, sem diferenças estatísticas entre os tipos tumorais.

Os achados deste estudo sugerem uma maior expressão de Ki67 em relação ao grau histológico nas usuárias de anticoncepcional oral, que possuíam pelo menos dois parceiros sexuais ao longo da vida e com história prévia de DST. Estudos têm demonstrado que o uso de anticoncepcionais orais é fator associado a carcinogênese cervical (Rosseau MC et al., 2000; Moreno V et al., 2002), promovendo a proliferação celular, bem como tornando as células vulneráveis à mutação durante a divisão celular [24, 25, 69, 70]. Quanto ao número de parceiros sabe-se que a maior exposição aumenta o risco de infecção por diferentes tipos virais, característico da transmissão sexual o que facilita a proliferação celular [71]. Juneja et al. (2003) [53] comentam em estudo que ter 2 ou mais parceiros aumenta em 2 a 4 vezes este risco.

Com relação à presença de DST, Castellsagué et al., 2002 confirma associação entre a presença de DNA-HPV, *Chlamydia trachomatis*, *Herpes vírus-2* e a infecção pelo HIV, aumentando o risco de desenvolvimento da lesão [61]

Conforme descrito por alguns autores não está bem definido o papel dos hormônios esteróides na gênese das lesões cervicais pré-neoplásicas e neoplásicas sendo apontado em alguns estudos como fator de risco, embora outros não tenham observado esta associação [26, 28, 57, 72]. Não foi observada neste estudo associação do uso de anticoncepcionais orais com a presença de DNA-HPV ou com a expressão de p16<sup>INK4a</sup>. Sabe-se, no entanto, que o HPV apresenta em sua

região regulatória, elementos responsivos a hormônios glicorticóides [70, 73]. A importância dos receptores hormonais nas lesões cervicais HPV induzidas vêm sendo pesquisada, com certa variação nos resultados, os quais não são conclusivos [26, 70, 73-75].

O uso freqüente de contraceptivos orais nos dias atuais e o aumento dos índices de infecção viral têm despertado o interesse em possíveis co-fatores para o progresso das lesões, uma vez que a grande maioria das pacientes não desenvolve a neoplasia [57, 70, 76]. A infecção por HPV aumenta a  $\alpha$ -hidroxilação do estradiol, elevando a quantidade de 16- $\alpha$  hidroxí estrogênio, um metabólito carcinogênico. Assim, monitorar a expressão deste marcador pode ser útil, podendo ser considerada um fator prognóstico[28]. A variabilidade encontrada nos diferentes estudos pode ser devida à metodologia diagnóstica empregada, a preparação de amostras, aos diferentes valores de pontos de corte para considerar os resultados positivos, como também a localização dos receptores e o tamanho da área lesada [73].

Neste estudo não se observou uma associação da infecção pelo HPV com a expressão do receptor de estrogênio, o que pode ser justificado pela baixa atividade viral, já que a maioria das lesões é de baixo grau. Já, no estudo conduzido por Fonseca Moutinho et al. (2004) [26] nas biópsias portadoras de NIC III ou carcinoma micro-invasor, este receptor foi expresso.

Um ponto de vista defendido por Webster et al.(2001) seria que estes hormônios aumentam o nível de apoptose induzido pelas proteínas E6 e E7 do HPV que, em presença de E2, induzem à morte celular [77]. Au et al. (2007) demonstraram através do gene que bloqueia o receptor de estrogênio e a função estrogênica na célula, a redução na expressão de mRNA E6 e E7, interrupção na proliferação celular e reativação de p53 e pRb.

Os achados deste estudo estão de acordo com resultados apresentados por outros autores, que relataram pequeno percentual de expressão de receptores de estrogênio no epitélio normal e em lesões HPV positivas [73, 78].

Com relação ao receptor de progesterona verifica-se maior expressão deste em biópsias de mulheres portadoras de DNA-HPV-AR. Sendo este agente um co-fator essencial para a carcinogênese, pode indicar que a progesterona possa apresentar um efeito permissivo para o desenvolvimento de lesões causadas por este vírus. No entanto, a concentração de progesterona depende da quantidade de estrogênio formada e, em tecidos negativos para receptor de estrogênio, a expressão do receptor de progesterona também foi baixa. A ausência de expressão deste receptor foi evidenciada nas lesões mais graves, provavelmente, em virtude destas lesões atingirem o estroma subjacente contribuindo para a negatividade. Este dado vem ao encontro daqueles detectados por alguns investigadores [73, 78, 79]. Pater et al. (1990) demonstraram a ação de progesterona em mecanismo de ativação oncogênica em células de ratos infectados com HPV 16, mas na presença de estrogênio, este efeito não foi observado[80].

Estudos verificando o efeito do fumo sobre a associação entre receptores hormonais e lesões cervicais não foram encontrados. No entanto, este efeito é descrito em neoplasias de mama [81, 82]. No presente estudo foi detectada maior expressão deste receptor em não-fumantes. Uma questão a ser considerada é se produtos metabólitos do cigarro inibiriam a expressão do receptor, no entanto, mais estudos são necessários para esclarecer este achado.

Com relação às usuárias de anticoncepcional oral, o uso de hormônios combinados (estrógeno e progesterona) poderia aumentar a expressão de progesterona, em virtude do metabolismo com formação de derivados que atuariam intensificando a presença viral. O estrogênio ativaria receptores  $\alpha$  e  $\beta$  intracelulares, os quais estimulam a transcrição de genes

específicos, provocando alterações na adesão celular, na migração, no aumento da proliferação de células e na resistência a drogas que induziriam à apoptose [76]. Além disto, a exposição de células tumorais HPV positivas aos hormônios estimularia a expressão dos oncogenes virais E6 e E7. Um estudo empregando as linhagens celulares CaSki e SiHa, desenvolvido por Ruutu et al. em 2006, através da técnica de RT-PCR e não verificaram diferença significativa em relação aos oncogenes E6 e E7. Já, em relação à expressão dos receptores, os autores observaram uma associação da expressão de receptores de estrogênio- $\alpha$  e os oncogenes E6 e E7, da linhagem SiHa. Para estes autores, estrogênio e progesterona aumentam a proliferação celular, tornando as células vulneráveis a mutações na diferenciação [70]. Quanto à proliferação, foi verificado que, a progesterona aumenta a proliferação nas linhagens tumorais (CaSki e SiHa). Este fato pode ser explicado pelo aumento na regulação do receptor para crescimento epidermal na superfície das células. Uma provável explicação na diferença das respostas das linhagens é devido à quantidade de receptores presentes ou pela mutação genética própria de cada tipo celular [70]. Em nosso estudo, a expressão do receptor de estrogênio não apresentou associação significativa com nenhum fator epidemiológico testado.

Poucos estudos consideram o efeito de fatores como fumo, uso de anticoncepcional oral e de comportamento sexual na associação entre a expressão de marcadores de proliferação ou hormonais com o grau de lesão histológica e ou a presença de HPV-DNA. Neste estudo reforça-se a importância de estabelecer a expressão imuno-histoquímica de p16<sup>INK4a</sup> no diagnóstico e no acompanhamento de lesões potencialmente ativas bem como, de aliar a detecção da expressão de Ki67 para confirmar estes achados. A associação das variáveis epidemiológicas estudadas com estes marcadores se torna importante, já que existem evidências de que algumas destas podem contribuir para o desenvolvimento das lesões.

## Referências:

- [1] Kalakun L, Bozzeti MC. Evolution of uterine cervical cancer mortality from 1979 to 1998 in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Cad Saude Publica* 2005; **21**(1): 299-309.
- [2]. Zereu M, Zettler CG, Cambruzzi E, Zelmanowicz A. Herpes simplex type 2 and Chlamydia trachomatis in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*, 2007; 105:172-175.
- [3]. Heselmeyer-Haddad K, Sommerfeld K, White NM et al. Genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in Pap smears predicts the development of cervical cancer. *Am J Pathol* 2005; 166:1229-1238.
- [4]. Murphy N, Ring M, Killalea AG et al. P16<sup>INK4A</sup> as a marker for cervical dyskariosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and Thin Prep TM smears. *J.Clin Pathol* 2003; 56: 56-63.
- [5]. Astbury K, Martin CM, Ring M et al. Future molecular aspects of cervical cytology. *Curr Diag Pathol* 2006; 12: 104-113.
- [6]. Tsai JH, Peng YW, Lin LY, Chou MC, Chiou HL. An association between human papillomavirus 16/18 deoxyribonucleic acid in peripheral blood with p16 protein expression in neoplastic cervical lesions. *Cancer Detection and Prevention* 2005; 29: 537-543.
- [7]. Villa LL. Biology of genital human papillomaviruses. *Int J Gynecol Obstet* 2006; 94(S1): p. S3-S7.
- [8]. Lorenzatto M, Cauduro S, Bronner C et al. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions?. *Human Pathol* 2005; 36: 1101-1107.

- [9]. Ekalaksnanam T, Pientong C, Sriampom S, Kongyingyones B, Pengsa P, Kleebkaow P, Kritpetcharat.O, Parkin DM. Usefulness of combining testiong for p16 protein and human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma screening. *Gynecol Oncol* 2006; 103(1): 62-66.
- [10]. Lambert AP, Anshau.F, Schmitt VM. p<sup>16INK4A</sup> expression in cervical premalignant and malignant lesions. *Experimental and Molecular Pathology* 2006; 80: 192-196.
- [11]. Samama B, Lipsker D, Boehm N. P16 expression in relation to human papillomavirus in anogenotal lesions. *Human Patho*, 2006; 37: 513-519.
- [12]. Queiroz C, Silva TC, Alves VA et al. P16<sup>INK4a</sup> expression as a potential prognostic marker in cervical pré-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res and Pract* 2006; 202: 77-83.
- [13]. Negri G, Moretto G, Menia E et al. Immunocytochemistry of p16INK4a in liquid-based cervicovaginal specimens with modified Papnicolaou counterstaining. *J Clin Pathol* 2007; 59: 827-830.
- [14]. Nakashima R, Fugita.M, Enomoto T et al. Alteration of p16 and p15 genes in human uterine tumours. *Br J of Cancer* 1999; 80(3/4): 458-467.
- [15]. Klaes R, Benner.A, Friedrich T et al. p16<sup>INK4a</sup> immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(11): 1389-1399.
- [16]. Van de Putte G, Kristensen G, Lie AK, Baekelandt M, Holm R. Cyclins and proliferation markers in early squamous cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; 92(1): 40-6.
- [17]. Kanao H, EnomotoT, Ueda Y et al. Correlation between p14<sup>ARF</sup>/p16<sup>INK4A</sup> expression and HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Letters* 2004; 213: 31-37.

- [18]. Volgareva G, Zavalishina.L, Andreeva Y et al. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer* 2004; 4: 58-67.
- [19]. Fernandes MGM, Ferreira FVA, Ferreira SNH et al. MIB-1 and p53 in penile intraepithelial and invasive squamous HPV- related lesions. *Rev Bras de Cancerologia* 2002; 48(1):29-37.
- [20]. Hong MK, Laski WV, Herman BE et al. Expansion of Ki-67 Proliferative compartment correlates with degree of dysplasia in Barrett's Esophagus. *Cancer* 1995; 75(2): 423-429.
- [21]. Junior JE, CavalcanteD, Medeiros FC, Ferreira FVA. Estudo Imunocitoquímico de proliferação celular (MIB-1) em sedimento de fluido peritoneal de endometriose pélvica. *RBAC* 2002; 34(2): 71-73.
- [22]. McCluggage WG, Immunohistochemistry as a diagnostic aid in cervical pathology. *Pathology* 2007; 39(1): 97-111.
- [23]. Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G et al. MIB-1 immunostaining in stage I squamous cervical carcinoma: Relationship with Natural Killer Cell Activity. *Gynecol Oncol* 1995. 58: 28-33.
- [24]. Rousseau M, Franco EL, Villa LL et al. A Cumulative Case - control study of risk factor profiles for oncogenic and nononcogenic cervical human papillomavirus infections. *Ca Epidemiol, Biomarkers & Prev* 2000; 9: 409-476.
- [25]. Moreno V, Bosh FX, Munoz N et al. International Agency for Research on Cancer Multicentric Cervical Cancer Study Group. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002; 359:1085-192.

- [26]. Fonseca-Moutinho JA, Cruz.E, Carvalho L et al. Estrogen receptor, progesterone receptor, and bcl-2 are markers with prognostic significance in CIN III. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14: 911-920.
- [27]. Lacey JV, Brinton.LA, Barnes WA et al. Use of hormone replacement therapy and adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 149-154.
- [28]. Park JS, Rhyn J, Kim CJ et al. Neoplastic change of squamo-columnar junction in uterine cervix and vaginal epithelium by exogenous estrogen in HPV-18 URR E6/E7 transgenic mice. *Gynecol Onco*, 2003; 89: 360-368.
- [29]. Mills B. Immunohistochemistry. In: *Laboratory Methods Immunotechnology*. . 1992, Washington: Ed American Registry of Pathology 247-255.
- [30]. Santos RTM, W.A., Kanamura CT, Nanagaki S.& Pinto GA. 1999. , Procedimentos em Imuno-histoquímica e Hibridização “in situ”. In: *Manual de Imuno-histoquímica*. 1999, São Paulo: Eds: Alves, V.A.F.; Bacchi, C.E., Vassalo J 229-259. .
- [31]. Bulten J, van der Avoort.IM, Melchers WJG et al. p14<sup>ARF</sup> and p16<sup>INK4A</sup>, two products of the same gene, are differently expressed in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 2006; 101:487-494.
- [32]. Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, Glass AG, Rush BB, Scott DR, Cadell DM, Kurman RJ, manos MM. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis* 1993; 20(5): 274-8.
- [33]. Coutlee F, Gravitt.P, Kornegay J Hankins C, Richardson H, Lapointe N, Voyer H, Franco E.. Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol* 2002; 40(3):902-7.

- [34]. Cuzick J, Terry.G, HoL, Hollingworth T, Anderson M, Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia.Br J Cancer 1994; 69(1): 167-71.
- [35]. Kjaer SK, Chacherian.B, van den Brule AJC et al. High- risk Human Papillomavirus is sexually transmitted: Evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001; 10: 101-106.
- [36]. Karstensen B, Poppelreuther S, Bonin M et al. Gene expression profiles reveal an upregulation of E2F and downregulation of interferon targets by HPV18 but no changes between keratinocytes with integrated or episomal viral genomes. Virology 2006; 353(1): 200-9.
- [37]. Hampl M, Wentzensen N, Vinikurova S et al. Comprehensive analysis of 130 multicentric intraepithelial female lower genital tract lesions by HPV typing. J Cancer Res Clin Oncol 2007; 133(4): 235-245.
- [38]. Torres CHS, Aragón MPA, Aristizabal LO. Papilomavirus y Factores asociados a Neoplasia Intraepithelial Cervical de Alto Grado en Cauca, Colombia. Rev Salud Publica 2006; **Sup 8**(1):47-58.
- [39]. Malanchi I, Accardi R, Diehl F et al.Human papillomavirus type 16 E6 promotes retinoblastoma protein phosphorylation and cell cycle progression. J Virol 2004; 78(24): 13769-78.
- [40]. Wright JD, Li J, Gerhard DS et al.Human papillomavirus type and tobacco use as predictors of survival in early stage cervical carcinoma. Gynecol Oncol 2005; 98: 84-91.
- [41]. Bosch FX, de.SanJosé.S, The Epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Dis Markers 2007; 23(4):213-217.

- [42]. Kruse AJ, Skaland I, Janssen E et al. Quantitative Molecular parameters to identify low-risk and high-risk early CIN lesions: Role of markers of proliferative activity and differentiation and Rb availability. *Int J Gynecol Pathol* 2004; 23: 100-109.
- [43]. Liang J, Mittal KR, Wei JJ, Yee H, Chiriboga L, Shukla P. Utility of p16<sup>INK4a</sup>, CEA, Ki67, P53 and ER/PR in the differential diagnosis of benign, premalignant, and malignant glandular lesions of the uterine cervix and their relationship with Silversberg Scoring System for endocervical glandular. *Int J Gynecol Pathol* 2006; 26: 71-75.
- [44]. Rivoire WA, Corleta.HVE, Brum IS, Capp E. *Biologia Molecular do Câncer cervical. Rev Bras Saude Mater Infant* 2006. 6(4).
- [45]. Albrecht V, ChevallierA, Bongain A, Lefebvre JC, Giordanengo V. Immunohistochemical and molecular study of severe cervical dysplasia associated with HPV-83. *Gynecol Oncol.* 2007;. 105(1): 252-5.
- [46]. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998, 153(6): 1741-1748.
- [47]. Agoff SN, Lin.P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. P16<sup>INK4a</sup> Expression correlates with degree of cervical neoplasia: A comparison with Ki-67 expression and detection of High-risk HPV types. *Mod Pathol* 2003; 16(7): 665-673.
- [48]. Longatto Filho A, Utagawa.ML, Shirata NK et al. Immunocytochemical expression of p16INK4A and Ki-67 in cytologically negative and equivocal pap smears positive for oncogenic human papillomavirus. *Int J Gynecol Pathol* 2005; 24:118-123.
- [49]. Munger K, Baldwin A, Edwards KM et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. Review. *J Virol* 2004;.78(21): 11451-11460.

- [50]. Malanchi I, Caldeira.S, Krutzfeldt M et al. Identification of a novel activity of human papillomavirus type 16 E6 protein in deregulating the G1/S transition. *Oncogene* 2002; 21(37): 5665-72.
- [51]. Brington LA, Herrero.R, Reeve WC, de Britton RC, Gaitan E, Tenorio F. Risk factors for Cervical Cancer by histology. *Gynecol Oncol* 1993; 51:301-306.
- [52]. Chan PKS, Chang.AR, Cheung JLK et al.Determinants of cervical Human Papillomavirus infection: Differences between high-and low-oncogenic risk types. *The J of Infect Dis* 2002; 185: 28-35.
- [53]. Juneja A, Sehgal A, Mitra AB, Pandey AA. Survey on a risk factors Associated with cervical Câncer. *Indian J of Cancer* 2003; 40: 15-22.
- [54]. Liu J, RoseB, Huang X et al.Comparative analysis of characteristics of women with cervical cancer in high-versus low incidence regions. *Gynecol Oncol* 2004;.94: 803-810.
- [55]. Rombaldi RI, Serafinni EP, Villa LL et al.Infection with human papillomaviruses of sexual partners of womwn having cervical intraepithelial neoplasia. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39:177-187.
- [56]. Ferrera A, Velema JP, Fihueroa M et al.Co- factors related to the causal relationship between Human Papillomavirus and invasive cervical cancer in Honduras. *Int J Epidemiol* 2000; 29:817-825.
- [57]. Vaccarella S, Herrero R, Dai M et al.Reproductive factors, Oral Contraceptive Use, and Human Papillomavirus Infection: Pooled Analysis of the IARC HPV prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(11): 2148-53.

- [58]. Lea JS, Coleman R, Kurien A et al. Aberrant p16 methylation is a biomarker for tobacco exposure in cervical squamous cell carcinogenesis. *Am J Obstet Gynecol*, 2004; 190(3): 674-9.
- [59]. Boyle DC, Smith JR. Infection and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 1999; 9(3): 177-186.
- [60]. Wallin KL, Wilund F, Luostarinen T et al. A population-based prospective study of Chlamydia trachomatis infection and cervical carcinoma. *Int J Cancer* 2002; 101: 371-374.
- [61]. Castellsagué X, Bosh FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 2002; 89: 191-199.
- [62]. Samoff E, Koumans EH, Markowitz LE, Sternberg M et al. Association of Chlamydia trachomatis with persistence of high-risk types of human papillomavirus in a cohort of female adolescents. *Am J Epidemiol*, 2005. 162(7): 668-75.
- [63]. da Costa RF, de Souza JA. Trichomonas vaginalis perturbs the junctional complex in epithelial cells. *Cell Res* 2005; 15(9): 704-16.
- [64]. Shew ML, Fortenberry JD, Tu W et al. Association of condom use, sexual behaviors, and sexually transmitted infections with the duration of genital human papillomavirus infection among adolescent women. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2006; 160(2): 151-6.
- [65]. Kanjanavirojkul N, Pairojkul C, Yuenyao P, Patarapadungkit N. Risk factors and histological outcome of abnormal cervix with human papilloma infection in northeastern Thai-women. *Asian Pac J Cancer Prev* 2006; 7(4): 567-570.

- [66]. Keating JT, Cviko A., Riethdorf S et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(7): 884-91.
- [67]. Sarian LO, Derchain SF, Yoshida A et al. Expression of cyclooxygenase - (COX-2) and Ki67 as relates to disease severity and HPV detection in squamous lesions of the cervix. *Gynecol Oncol* 2006; 102(3): 537-41.
- [68]. Koyamatsu Y, Yokoyama M, Nakao Y et al. A comparative analysis of human papillomavirus types 16 and 18 and expressing of p53 gene and Ki-67 in cervical, vaginal, and vulvar carcinomas. *Gynecol Oncol* 2003; 90: 547-551.
- [69]. Brabin LA. Interactions of the female hormonal environment, susceptibility to viral infections, and disease progression. *Aids Patient Care and STDs* 2002; 16(5): 211-221.
- [70]. Ruutu M, Wahlroos N, Syrjänen K, Johansson S, Syrjänen S. Effects of 17 beta-estradiol and progesterone on transcription of human papillomavirus 16 E6/E7 oncogenes in CaSki and SiHa cell lines. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 1261-1268.
- [71]. Svare EL, Kjaer HL, Poll P, Tjong-A-Hung SP, Sschemper J. Risk factors for HPV Detection in Archival Pap smears. , A population-based study from Greenland and Denmark. *Eur J Cancer* 1998; 34(8): 1230-1234.
- [72]. Munoz N, Franseschi S, Bosetti C et al. International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*, 2002; 359(9312): 1093-101.
- [73]. Coelho FRG, Prado JCM, Pereira Sobrinho JS et al. Estrogen and Progesterone receptors in human papillomavirus cervical neoplasia. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 83-88.

- [74]. Robertson DI, Paslawski.D, Duggan MA, Stuart nGC, Nation JG. Estrogen and progesterone receptor, human papillomavirus, and DNA ploidy analysis in invasive carcinoma of the cervix in pregnancy. *Am J Clin Pathol* 1993; 100(1): 18-21.
- [75]. Gonzalez Sanches JL, Chavez Brambila.J, Maricela Roman A, Infante Martinez R, Salazar Esquivel LE. Value of estrogen and progesterone receptors in the management of intraepithelial squamous lesions of low grade. *Gynecol Obstet Mex*, 2001; 69: 1-5.
- [76]. Au WW, Abdou-Salama.S, Al-Hendy A. Inhibition of growth of cervical cancer cells using a dominant negative estrogen receptor gene. *Gynecol Oncol* 2007; 104: 276-280.
- [77]. Webster K, TaylorA, Gaston K. Oestrogen and progesterone increase the levels of apoptosis induced by the human papillomavirus type 16 E2 and E7 proteins. *J Gen Virol* 2001; 82: 201-213.
- [78]. Bekkers RL, van de Avoort.IA, Melchers WJ, Bulten J, de Wide PC, Massuger LF. Down regulation of estrogen expression in an early event in human papillomavirus infected cervical dysplasia. *Eur J Gynecol Oncol* 2005; 26(4): 376-382.
- [79]. Horn LC, Richter.CE, Eienkel J et al. p16, p14, p53, cyclin D1, and steroid hormone receptor expression and human papillomaviruses analysis in primary squamous cell carcinoma of the endometrium. *Ann Diagn Pathol* 2006; 10(4): 193-6.
- [80]. Pater A, Bayatpour.M, Pater MM. Oncogenic transformation by human papillomavirus type 16 deoxyribonucleic acid in the presence of progesterone or progestins from oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162: 1099-103.
- [81]. Terry PD, Rohan.TE. Cigarette smoking and the risk of breast cancer in women: a review of the literature. *Review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(10 Pt1): 953-71.

- [82]. Manjer J, Malina J, Berglund G, Bondeson L, Garne JP, Janzon L. Smoking associated with hormone receptor negative breast cancer. *Int J Cancer* 2001; 91(4): 580-4.
- [83]. Wang Q, Li X, Wang L, Feng YH, Zeng R, Gorodeski G. Anti-apoptotic effects of estrogen in normal and cancer cervical epithelial cells. *Endocrinology* 2004; 145: 5568-5579.

## **Article 1: EXPRESSION OF P16, KI67 AND HORMONE RECEPTORS IN UTERINE CERVICAL LESIONS AND THEIR EPIDEMIOLOGICAL CORRELATES.**

Mylius, L.C.M<sup>1,2</sup>, Edelweiss, M.I.A.<sup>1,4</sup>, Meurer, L<sup>4</sup>, Igansi, C.N.<sup>3</sup> & Bozetti, MC<sup>1,3</sup>

1. Post-graduate Program in Medical Sciences at Federal University of Rio Grande do Sul, Faculty of Pharmacy of the Federal University of Rio Grande do Sul, 3. Post-graduation Program in Epidemiology at Federal University of Rio Grande do Sul, 4. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Financial Support: FIPE, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; CNPq/Brazil**

**Gynecol Oncol**

### **Abstract:**

The expression of cellular cycle markers may help to identify and to characterize cervical lesions. The purpose of this study was to verify the frequency of Human Papillomavirus (HPV) infection and the expression of p16<sup>INK4A</sup>, nuclear antigen Ki67, estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR), in biopsies of uterine cervix. The presence of HPV-DNA was identified in 83.0% of the biopsies, and 46.0% of those were positive to high-risk (HR) HPV 16, 18 or 31. Regarding the anatomopathological (AP) analyses, 7.0% had types high-grade lesions, 59.0% had low-grade lesions and 34.0% did not show any alterations. The expression of p16<sup>INK4a</sup> was observed in 85.3% of the women with HR-HPV-DNA ( $p=0.02$ ), and all of them were positive to HPV-16 ( $p=0.01$ ). The association between p16<sup>INK4a</sup> expression and HPV-DNA was statistically significant in smokers ( $p=0.03$ ), in those with history of SDT ( $p=0.01$ ) and in those with three or more lifetime sexual partners ( $p=0.02$ ). The expression of Ki67 was observed in

100.0%, being 31.0% and 32.0% for high-grade and low-grade lesions and for normal fragments ( $p<0.003$ ). No significant association was observed between the expression of ER and the studied outcomes. The expression of PR was observed in 42.0%, 26.5% of which presented HR-HPV ( $p=0.023$ ). The expression of PR was higher in non-smokers ( $p=0.02$ ), in those who were taking oral contraceptive ( $p=0.03$ ) and presented lower school level ( $p=0.04$ ). The associations of epidemiological aspects with the expressions of p16<sup>INK4a</sup> and Ki67 are important for the diagnosis and follow-up of potentially active lesions.

## II. INTRODUCTION

Cervical cancer is an important public health problem that affects women worldwide and in Brazil, it is the third cause of death due to neoplasia, just behind skin and breast tumors [1, 2].

This cancer has a rate of cure, as its latency period is long, and, if detected in its early phases, the treatment is effective. It's elevated prevalence suggests that a high number of women seems to ignore the problem or does not have access to tracking programs [1]. .

Screening programs, based on the evaluation of cytological samples, have reduced the incidence and mortality rates. However, a single cytological evaluation may be insufficient, mainly due to problems with the sample collection, which many times are .....non-representative areas or are incorrectly interpreted. Besides, some early alterations may not be easily detected [3], presenting limitations regarding sensitivity and specificity. False negative rates range from 15 to 50% and false positive rates may reach 30% [4, 5].

This fact emphasizes that it is necessary to establish new markers to detect alterations in epithelial cells to help diagnosis, prognosis and monitoring of treatments.

Human Papillomavirus (HPV) is strongly associated with cervical cancer. Around 40 of over 100 types that have been identified and classified as high- and low-risk types may be the cause of urogenital tract neoplasias [6, 7].

It is known that the viral genome remains extra-chromosomally in benign infections and, when integrated into the cellular DNA of the host, it provokes a rupture in E2 region of the virus and an overexpression of oncoproteins E6 and E7, causing persistent infection and neoplastic progression. These oncoproteins interact with several proteins that regulate the cellular cycle and cause inactivation of the tumor suppressing genes. [8-11].

Oncoprotein E6 induces a premature degradation of tumor suppressing protein 53 through the ubiquitin route. Oncoprotein E7 binds to tumor suppressing protein pRb that usually inhibits the cellular cycle progression until phase S, which makes it more complex with transcription factor E2F [10]. Oncoprotein E7 of HPV interacts and neutralizes the function of proteins p107 and p130, similar to Rb. Such interaction, analogous with that of cyclin-dependent kinase, enables phosphorylation, induces pRB degradation, resulting in the release of transcription factor E2F. This way, it stimulates the infected cell to enter phase S of the cellular cycle, provoking increased inhibitor concentration of the cyclin-dependent kinase, p16<sup>INK4A</sup> [12, 13]. This protein induction occurs during immortalization in pre-neoplastic lesions, an early event that results in tumoral genesis [12].

Studies have shown an overexpression of p16<sup>INK4a</sup> in positive HPV lesions [14-18] and point out the importance of this marker in the detection of pre-neoplastic lesions and uterine cervical lesions. However, the negativity to p16<sup>INK4a</sup> is not sufficient to exclude patients from the risk group.

Cells in proliferation express in their core a non-histone protein, of short half-life, named Ki-67 or MIB-1 [19] and monoclonal antibody Ki-67 detects the nuclear antigene expressed in all cellular cycle phases (G1, S, G2, M), except for phase G0 [20-22].

The immunohistochemical expression of Ki67 has shown the relation involving the intensity of such expression, the histological grade and the tumor behavior, suggesting that its intensity is a useful marker in the prognosis of lesions in soft tissue diseases, lymphoproliferative diseases and in some less differentiated carcinomas with high mitotic index [23]. This marker is valuable to diagnosis as a marker of proliferation, mainly in gynecological pathology,

considering that the squamous cervical lesions increase the proliferation index, from the basal layer of normal epithelium to cases of cervical intraepithelial neoplasia of grade 3 (CIN 3).

The unbalance between the proliferation caused by virus and apoptosis seems to be insufficient for the development of invasive cervical cancer. The exposure to several co-factors [24, 25], including steroid hormones and progesterone, seems to contribute to the development of this disease [26].

The presence of estrogen and progesterone receptors in cervix and HPV-induced lesions suggests that the cervical epithelium might react to exogenous hormones, which contribute to the development of lesions, which may lead to cervical carcinoma [27].

The estrogen effect has been associated with the specific route of oxidative hormonal metabolism. Therefore, HPV-induced infections may contribute to the formation of potentially carcinogenic estrogen metabolites [28].

The hormonal replacement or the contraceptive use has been currently adopted by many women and few studies have been concerned about clarifying the association of these factors with the genital infection caused by HPV and its consequences.

This study verified the immunohistochemical expression of p16<sup>INK4A</sup>, nuclear antigen Ki67, estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR), in biopsies of uterine cervix of patients with cervical lesion.

#### **Material and Methods:**

A cross-sectional study was conducted between February 2003 and January 2006 to verify the frequency of infection caused by Human Papillomavirus (HPV) involving asymptomatic women that searched for health care at a Primary Care Unit in southern Brazil.

This analysis involved the women that participated in this study who had biopsy of uterine cervix, being 89 women in total. All participants answered a standardized epidemiologic questionnaire about demographic characteristics, previous habits, reproduction history and sexual behavior.

#### **Immunohistochemical procedure:**

Formalin-fixed paraffin-embedded biopsy cuts (4µm thick, representative of the lesion) were submitted to the immunohistochemical procedure adopted by the Pathology Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS - Brazil, described by Mills in 1992 and Santos et al. in 1999 [29, 30], which consists of the following stages: deparaffinization and rehydration, antigenic recovery in endogen peroxidase inactivation and blocking of unspecific reactions. The primary antibody was incubated for 12 hours at 4°C, according to standardized dilution, followed by the application of streptavidin-biotin-peroxidase-complex (LSAB, Dako), then the application of and development with diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB Kit, Dako) and, finally, contrasted with hematoxilin. Chart 1 shows the description of reagents and dilutions.

The positive control to Ki67 of the reaction was the cut containing lymph node with reactive hyperplasia, and the negative control was performed in the same type of sample without the primary antibody.

For the detection of p16<sup>INK4a</sup>, a slide colored with high-grade intraepithelial lesion known to be positive for HPV was used as positive control. The slide without the primary antibody was used as negative control.

Negative and positive controls for hormone (estrogen and progesterone) receptors were used. In all cases, from 100 to 200 cells were detected and the results were expressed in percent.

**Chart 1: Description of reagents employed**

Antigen Source	Antibody	Clone	Dilution
Gene P16 Neomarkers,CA,USA	P16 <sup>INK4a</sup>	16P07	1:75
Ki67 DAKO,Glostrup, Denmark	Anti-Ki67	MIB-1	1:30
ER DAKO Cytomation	Anti-RE alfa	1D5	1:50
PR DAKO,Glostrup, Denmark	Anti RP	PgR636	1:50

RE - Estrogen Receptor  
PR - Progesterone Receptor

Two pathologists who were blinded to the clinical and histopathological information independently analyzed the slides. The final result was obtained through by consensus reviews between the two pathologists.

**Interpretation of p16<sup>INK4a</sup>, Ki67, Estrogen and Progesterone Receptors:**

Both cytoplasmatic and nuclear colorings were considered as positive for cells with p16<sup>INK4a</sup>. The p16<sup>INK4a</sup> intensity expression in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) were graded as follows Bulten et al., 2006 [31]: negative (-) no cells expressing coloring, positive (+) when the percent of cells expressing coloring was within 1-25% range, positive (++) when the percent of cells expressing coloring was within 26-75% range and positive (+++) the when percent of cells presenting coloring was over 75%. The cell expression pattern was classified as:

focal, if the expression was concentrated on some areas, and diffused, if the expression was scattered across the slide.

Ki67 was considered only if the cell core was colored, and the percent of cells expressing it was also determined.

For the detection of estrogen and progesterone receptors, coloring was classified as 4 scales with 0 to 3 plus signs, according to the percent and intensity of nuclear coloring in the epithelium, normal tissue, atypical epithelium (CIN 1, CIN 2 and CIN 3) and invasive carcinoma.

#### **DNA Extraction and HPV Analysis:**

Cytological samples were collected for the conventional cytopathologic analysis and for the Polymerase Chain Reaction (PCR) test. The collected sample was stored at -20°C until the DNA extraction was performed, using the PCR technique.

The samples were centrifuged at 7000 rpm for 10 minutes, resuspended and digested in 200 µg/ml of proteinase K (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) for 18 hours at 37°C. The DNA was submitted to 94°C for 10 minutes and utilized in the PCR test. The PCR technique was directed to gene L1 and the primers utilized were: MY09 5'-CGT CC<sup>A</sup>/<sub>C</sub> AA<sup>A</sup>/<sub>G</sub> GGA<sup>A</sup>/<sub>T</sub>AC TGA TC-3' and MY11 5'-GC<sup>A</sup>/<sub>C</sub> CAG GG<sup>A</sup>/<sub>T</sub> CAT AA<sup>C</sup>/<sub>T</sub> AAT GG -3'. The PCR study conditions were described by Bauer et al (1993) [32] and Coutlée et al. (2002) [33]. For the PCR control, beta-globin primers were developed and tested in all samples.

#### **Study on the most frequent oncogenic types**

All positive samples in the DNA-HPV screening were classified for HR (HPV-16, -18 and -31), using specific primers corresponding to regions E6 and E7 of the viral genome. The enlargement conditions and primers utilized are based on the methodology described by Cuzick et al. (1994) [34] (Chart 2):

**Chart 2: Primers and Amplification's conditions**

<b>Viral Type</b>	<b>Sequence</b>	<b>Ta<sup>a</sup> (°C)</b>
<b>HPV-16</b>	5'...GC GAT CCT GTC TGC TTT TAT ACT AA...3' (sense)	54°C
	5'...AAG GCC AAC TAA ATG TCA C...3' (antisense)	
<b>HPV-18</b>	5'...TGC AGC ACG AAT GGC ACTGGC CTG...3' (sense)	70°C
	5'...CAC GGC GAC CCT ACA AGC TAC CTG...3' (antisense)	
<b>HPV-31</b>	31A 5'...TACCTGTGTTTCTGTAAAC...3' (sense)	52 °C
	31S 5'...AGAAAGACCTCGGAAATTG...3' (antissense)	

<sup>a</sup> **Annealing temperature**

In order to control the operation of the reactions, a positive control was tested to each PCR of DNA from the clinical samples, which consisted in a 450pb fragment corresponding to cells Caski and Siha (celled infected with HPV) and a negative control without any DNA. In all tested samples complementary primers to human  $\beta$ -globin (gH20 and PC04) gene were used as internal control of the reaction [32].

The result of the anatomopathological analysis was classified as normal, LSIL (CIN I) and HSIL (CIN II, III and invasive cancer).

#### **Variables of the Study:**

The study outcomes were: histopathological diagnosis of the uterine cervix lesions, presence of HPV-DNA and the identification of high-risk types (HPV-HR) (16, 18 and 31). The biologic markers: p16<sup>INK4a</sup>, Ki67 and estrogen and progesterone receptors were related to such outcomes. Independent variables such as: demographic data, sexual behavior, reproduction and previous morbidities were also studied.

**Data Quality Control:**

All information was stored in a database using a double-insertion of all data. In total, 20% of the questionnaires were randomly selected and crosschecked with the original ones to verify possible errors and discrepancies.

**Statistical Analysis:**

Data analysis was performed using Chi-square test (Pearson and Mantel-Hansel in the stratification of confounding variables). Odds ratios, with their correspondent confidence interval of 95%, were also estimated. P value for statistical significance was  $\leq 0.05$ .

**Ethical Considerations:**

This protocol was approved by the Research Ethics Committees of Grupo Hospitalar Conceição (Nº 112/2002) and Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Nº 03083). All participants signed an informed consent form.

**Results:**

A total of 89 women had biopsy of the uterine cervix and were analyzed in this study. Table 1 describes the characteristics of the studied women. Most women (57.3%) were 35 years old or older, white (83.2%), 43.8% started sexual life at 17 years old or before and 46.1% have had at least three sexual partners in their lifetime. Around 75% took oral contraceptive (OC), 25% were smokers and 68% presented history of sexually transmitted diseases (STD).

**Table 1:** Characteristics of the studied population

Characteristics	N (%)
<b>Age (years)</b>	
< 35	38 (42.7)
≥ 35	51 (57.3)
<b>Marital status</b>	
Married	45 (50.6)
Single	44 (49.4)
<b>Education</b>	
Elementary not concluded	24 (27%)
Elementary concluded – to not conclude High school	26 (29.2%)
High school concluded or more	39 (43.8%)
<b>Skin color</b>	
White	74 (83.1%)
Non white	15 (16.9%)
<b>Menarche</b>	
< 12 years old	27 (30.3)
≥ 12 years old	62 (69.7)
<b>First sexual intercourse</b>	
≤ 17 years old	39 (43.8)
> 17 to 19 years old	25 (28.1)
20 years old or older	25 (28.1)
<b>Number of lifetime partners</b>	
Up to 1 partner	29 (32.5)
2 partners	19 (21.3)
3 partners or more	41 (46.1)
<b>Number of children</b>	
≤ up to 3 children	51 (57.3)
> 3 children	38 (43.7)
<b>First pregnancy</b>	
≤ 17 years old	20 (22.5)
> 17 years old	51 (57.3)
<b>Oral contraceptive use</b>	
No	22 (24.7)
Yes	67 (75.3)
<b>Smoking</b>	
No	67 (75.3)
Yes	22 (24.7)
<b>STD</b>	
No	28 (31.5)
Yes	61 (68.5)
<b>Co-Infection (HPV and Chlamydia)</b>	
No	73 (82)
Yes	16 (18)

The presence of HPV-DNA was identified in 83% (74/89) of the biopsies. Among HPV positive women, 46% (34/74) had high-risk HPV (16, 18 or 31).

The anatomopathological (AP) diagnosis showed high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) in 7% of the biopsies and low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) in 59%; 34% did not show any alteration.

Table 2 describes the distribution of AP results according to the presence or absence of HPV-DNA. All cases of HSIL, 88% of LSIL and 72% of normal women were HPV positive ( $p=0.08$ ).

**Table 2:** Association between the anatomopathological result and HPV-DNA

<b>Anatomopathological result</b>	<b>n</b>	<b>HPV +</b>	<b>HPV-</b>	<b>p*</b>
<b>Normal</b>	<b>32</b>	<b>23</b>	<b>09</b>	
<b>LSIL</b>	<b>51</b>	<b>45</b>	<b>06</b>	<b>0.08</b>
<b>HSIL</b>	<b>06</b>	<b>06</b>	<b>00</b>	

\* p for Pearson's  $\chi^2$  test

The expression of p16<sup>INK4a</sup> was evaluated regarding its nuclear or cytoplasmatic presence, expression intensity and pattern, as well as the quantity of cells (%) expressing such marker.

It was noted that 85.3% (29/34) of the positive women for HR-HPV-DNA expressed protein p16<sup>INK4a</sup> and that this association was statistically significant ( $p=0.02$ ). All biopsies positive for HPV-16 (16/34) expressed the protein ( $p=0.01$ ).

The analysis of p16<sup>INK4a</sup> expression intensity suggests that, in the more severe lesion, the is stronger protein expression. There was a statistically significant association between the expression intensity (strong, moderate and mild) and the lesion grade. A statistically significant association was also observed between the p16<sup>INK4a</sup> expression pattern and the lesion grade

( $p=0.001$ ). The scattered pattern was present in 100% of the samples whose intensity was strong, 76% of moderate intensity cases and 50% of mild intensity cases.

Among the epidemiologic variables studied, some were associated with the presence of HPV-DNA and HR-HPV-DNA and related to the expression of p16<sup>INK4a</sup>, Ki67 and progesterone receptor. No independent variable modified modified the association between the expression of p16<sup>INK4a</sup> and the anatomopathological analysis.

The association between the expression of p16<sup>INK4a</sup> and HPV-DNA was statistically significant among smokers ( $p=0.03$ ; OR: 11.25; CI 95%:1.11-114.4), among women with history of STD ( $p=0.01$ ; OR: 6.82; CI 95%: 1.53-30.3), among women with first intercourse sexarca between 17 and 19 years( $p=0,04$ ; OR:8,50 IC95%: 1,97-74,4) and in women with three or more sexual lifetime partners ( $p=0.02$ ; OR: 8.12; CI 95%: 1.31-50.2). Education level and oral contraceptive use did not modify the association between p16<sup>INK4a</sup> and HPV-DNA.

Regarding Ki67, the anatomopathological analysis showed a nuclear presence in 100.0%, 31.0% and 32.0% of high-grade and low-grade lesions and fragments classified as normal, respectively. This association was statistically significant ( $p=0.003$ ).

No studied variables affected the association between the expression of Ki67 and the presence of HPV-DNA. However, there was a significant association between this marker and the anatomopathological analysis result, between oral contraceptive users ( $p=0.005$ ; OR: 3.9; CI 95%: 1.67-7.13), women with STD history ( $p=0.04$ ; OR: 12.0; CI 95%: 11.62-34.77) and women with at least two sexual partners in their lifetime ( $p=0.03$ ; OR: 2.6; CI 95%: 1.5-5.7).

As Ki67 and p16<sup>INK4a</sup> are proliferation and oncogenicity markers, the expression of Ki67 was analyzed regarding the expression of p16<sup>INK4a</sup>; 69.7% of the biopsies presenting higher

percent of p16<sup>INK4a</sup> expression (>50% of the cells) also expressed the proliferation marker Ki67 ( $p=0.012$ ), as illustrated in Table 3.

**Table 3:** Association between the expression of Ki67 and p16<sup>INK4a</sup> on cervical biopsies

Expression of Ki67	Quantity of p16				p*
	No Expression	≥1 and ≤10	>10 and ≤50	>50	
<b>Positive</b>	06 (23.1%)	0 (0.0%)	4 (25.0%)	23 (53,5%)	<b>0.012</b>
<b>Negative</b>	20 (76.9%)	4 (100.0%)	12(75.0%)	20 (46.5%)	

\*  $p$  value for Pearson's  $\chi^2$  test

There was no association between the presence or absence of HPV, regardless of being of high-risk type, with the expression of estrogen receptor ( $p>0.05$ ). Only 18.0% (6/34) of the women with high-risk HPV expressed such receptor. In terms of stroma, the behavior was similar, the receptor expression occurred only in 12.0% (4/34) of the cases and in 2.9% (1/34) of normal epithelium, with no association with high-risk HPV.

No statistically significant association was observed between the expression of estrogen receptor and the studied outcomes.

The expression of progesterone receptor occurred in 42% (37/89) of the studied cases. Among the 37 positive biopsies for progesterone receptor, 26.5% (9/37) were positive for high-risk viral types ( $p=0.023$ ). In terms of stroma, the receptor expression occurred in 36.0% (32/89) of the samples.

When analyzing the expression of progesterone receptor in relation to the epidemiologic variables, some aspects should be noted. In women with at least three lifetime sexual partners, an

association of borderline significance was observed between such receptor and the presence of HR-HPV-DNA ( $p=0.06$ ).

The expression of progesterone receptor was higher in non-smokers ( $p=0.02$ ), regardless of the HPV-DNA type detected. A greater expression of this receptor was also observed in oral contraceptive users ( $p=0.03$ ) and women of lower school level ( $p=0.04$ ).

### **Discussion:**

In this study, the immunohistochemical expression of cellular markers p16<sup>INK4a</sup>, Ki67, estrogen and progesterone receptors was determined, in patients who had uretine colon lesion biopsies, with or without DNA-HPV, as well as the association between such markers and the studied epidemiologic variables.

The importance of persistent HPV-induced infection in cervical lesions at different histological grades has been demonstrated in several studies [35-38]. The transforming activity of the virus agrees with its capability of replication and differentiation in the epithelium after its integration. The high-risk viral types are important etiological agents of the cervical cancer [39].

Although the infection is a prerequisite for the development of cervical cancer, only a small proportion of women with viral infection develops neoplasia. The genetic variability of the host and environmental cofactors, including smoking habit, steroid hormones, sexual behavior and the presence of other infectious agents, have been identified in the various phases of cervical pathogenesis evolution [40, 41].

Some authors have suggested that the viral integration leads to a loss of control in the expression of oncogenes E6 and E7, causing disorderly cell proliferation. However, the methods

that can detect such alterations require sophisticated procedures, which many times are not accessible in routine practice [42]. The expression of p16<sup>INK4a</sup>, a cyclin-dependent kinase (CDK4/6-cyclin D) inhibitor, occurs due to the inhibition of pRB (retinoblastoma protein), a tumor suppressing gene depleted by oncoprotein E7 of high-risk HPV. This marker has been mentioned in some studies as being promising in the detection of pre-neoplastic lesions and neoplastic lesions of uterine cervix [43-45].

In this study, the frequency of HPV-induced infection in the cervical biopsies was 83.0%, 46.0% of which were women with high-risk HPV. An association of p16<sup>INK4a</sup> with the presence of HR-HPV-DNA was observed. These findings corroborate the results of other researchers [9, 12, 37, 46-48]. Besides, all positive samples for HPV-16 expressed this protein. Other studies also report higher expression of p16<sup>INK4a</sup> in women infected with HPV-16, a higher aggressiveness of this virus type [10, 12, 37, 46].

The different histological grades found in this study indicate the presence of infection; however, the chromosomal integration of viral DNA does not seem to be present in most cases, since a great part of the biopsies was classified as low-grade lesion. Once integrated into the DNA, there is a rupture in the genome, between regions E1 and E2, an uncontrolled expression of oncogenes E6 and E7, causing the cell proliferation and thus increasing the risk of high-grade lesions [42].

Regarding the expression of p16<sup>INK4a</sup>, the findings suggest an association between the increased expression of this protein and lesion worsening. The type of lesion predominating in this study, the LSIL (low grade), suggests an initial lesion with the presence of episomal HPV having a low number of viral copies. Usually, in these cases, proteins E6 and E7 are not capable

of inducing abnormalities in the centrosome or mitotic defects. In many tumors, abnormalities in centrosome appear as a consequence of cytokinesis, problems in cell division that occur in cells that also have nuclear abnormalities [49].

In infections caused by low-risk HPVs, oncoproteins E6 and E7 contribute to the viral cycle; however, the transforming activity is low and does not lead to genetic instability, representing low efficiency in the destabilization of the oncoprotein E7 bind to pRB. Regarding oncoprotein E6 of low-risk HPV, the interaction with p53 does not occur efficiently either. Therefore, its degradation is not complete [49, 50]. The role of p53 is to protect the genome integrity, inducing a delay in the cellular cycle or apoptosis, in case of DNA damage [39].

Thus, infections caused by high-risk HPV are a key factor in the development of cervical intraepithelial neoplasia, provoking uncontrolled expression of viral oncogenes and binding of oncoprotein E7 to pRb, with the release of transcription factor E2F [12].

The early age for the first sexual relationship, the number of partners along the woman's lifetime, the history of sexually transmitted diseases, the use of oral contraceptives and smoking habit have been considered as co-factors in the development of cervical cancer in some studies [51-54]. The findings of this study suggest a higher expression of p16<sup>INK4a</sup> in women presenting early age for the first sexual relationship and in women with more sexual partners in their lifetime (three or more). A possible explanation would be that, for having started their sexual life earlier, they tend to have a higher number of partners, become more exposed and vulnerable to the infection; and it should be noted the lack of access to knowledge on the pathogenicity of some sexually transmitted agents, health education and the fact of depending on public health services, which some times are not so efficient [55]. Then, there is increased possibility of exposure to

oncogenic HPVs, which stimulate the cell proliferation, justifying the expression of p16<sup>INK4a</sup> [52-54, 56, 57]. Torres et al., 2006, in his study, did not determine a significant correlation between a viral infection and the number of partners; however, the early age for the first sexual relationship (before 17 years old) was associated, suggesting the existence of a latency period to viral oncogenic potential. It also explains the uterine cervix is more vulnerable in menacme, when the tissue suffers metaplasia, the infection may reach the basal layer and establish a persistent infection [38].

Although other studies have reported an association of these factors with the presence of HPV-induced infection, no study was found associating the expression of p16<sup>INK4a</sup> with such findings.

This study verified a significant association involving the expression of p16<sup>INK4a</sup> and the presence of HPV-DNA among smokers. Concerning the smoking habit, it is known that it can facilitate the viral integration of HPV-18 and reduce the apoptosis capability for infections caused by HPV-16, justifying the higher expression of this protein. Besides, cigarette components, such as nicotine, cotinine and N-nitrosamines have been detected in the mucus of smokers, which contributes to the formation of toxic products that damage the cellular DNA [40]. Such finding confirms the descriptions of Lea et al. (2004) [58], where the authors report the detection of p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation, epigenetic event and its overexpression in smokers with high-grade and carcinoma dysplasia. Wright et al., (2005) [40] observed that the presence of HPV 18 or 45 is associated with shorter survival time, especially when related to the tobacco smokers.

In a study conducted by Rombaldi et al. (2006) [55], in men with HPV-induced infection, no association was verified with smoking habit. It also says that this association already

demonstrated in women could be justified by local immunity, structural differences in the female epithelial tissue that would favor the infection and its permanence.

Some sexually transmitted agents have been associated with the neoplastic etiology, either related to HPV-induced infection or not, such as *Chlamydia trachomatis* and *Trichomonas vaginalis* [59-64]. This study suggests a significant association between the expression of p16<sup>INK4a</sup> and the presence of DNA-HPV in women with STD history. For Kanjanavirojkul et al (2006) [65], having more than one partner and a sexually transmitted history and being multipara were considered as important risk factors for carcinogenesis.

The expression of Ki67 has been used in some studies as a tool to help the diagnosis of potentially active lesions. In this study, there was an association between the expression of Ki67 and the anatomopathological evaluation of the lesions, with higher expression in severer lesions. In terms of Ki67, although the biopsies contained DNA-HPV, the absence or the minimum expression (<5.0%) did not exclude cases of low-grade lesion. On the other hand, in normal or metaplastic epithelial situations, this marker expression may also reflect the cell cycle activity. In these cases, it is possible to note the low specificity of this biomarker for the confirmation or exclusion of pre-invasive lesions [66].

Obviously, the use of biomarkers presents powerful evidence, as well as diagnostic failures. Such effect may be verified through the analysis of Ki67 expression, which is overexpressed in such lesions [42].

Keating et al. (2001) [66], observed a strong association between the histological grade and the expression of Ki67. The expression was suprabasal in 18 out of 19 cases of HSIL. A significant number of HSIL cases showed Ki67 coloring across all its layer (12 out of 19 cases). The expression of Ki67 in upper 2/3 portions of the epithelium is a strong indicator of HSIL,

being less evident in cases of LSIL, even in immature variants, which demonstrates in these cases a smaller viral cytopathic effect. A variation was also observed in the expression intensity, associated with the lesion grade. This finding was confirmed by Sarian et al. (2006) [67].

In a study conducted by Koyamatsu et al. (2003) [68], the expression of Ki67 and p53 were demonstrated in cervical, vaginal and vulvar carcinomas. The expression of Ki67 was observed in 70.0% of cervical tumors, 75.5% of vaginal tumors and 67.7% of vulvar carcinomas, with no statistical differences among the tumor types.

The findings of this study suggest a higher expression of Ki67 in terms of histological grade in oral contraceptive users that had at least two partners in their lifetime and STD history. Studies have demonstrated that the use of oral contraceptives is a factor associated with the cervical carcinogenesis [24, 25], promoting the cell proliferation and making the cells vulnerable to the citation during the cell division [69, 70]. Regarding the number of partners, it is known that higher exposure increases the risk of infection caused by different viral types, which is characteristic of sexual transmission [71], facilitating the cell proliferation. Juneja A et al., 2003 [53] comment in a study that having 2 partners or more increases this risk 2 to 4 times. Regarding the presence of STD, Castellsagué X et al., 2002, confirms the association between the presence of DNA-HPV, Chlamydia trachomatis, Herpes virus-2 and the infection caused by HIV, increasing the risk of lesion development [61].

As described by some authors, the role of steroid hormones in the genesis of cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions is not well defined, which is mentioned in some studies as a risk factor, although other studies have not observed this association [26, 28, 57, 72]. No association of oral contraceptive use with the presence DNA-HPV or with the expression of p16<sup>INK4a</sup> was observed in this study. However, it is known that HPV presents in its regulatory region elements

that are responsive to glucocorticoid hormones [70, 73]. The importance of hormone receptors in HPV-induced cervical lesions has been studied, with a certain variation in the results [26, 70, 73-75].

The frequent use of oral contraceptives today and the increased viral infection rates have attracted the interest in possible cofactors for lesion evolution, as most women does not develop neoplasia [57, 70, 76]. The HPV-induced infection increases  $\alpha$  estradiol hydroxylation, enhancing the quantity of 16- $\alpha$  estrogen hydroxyl, a carcinogenic metabolite. Thus, this marker monitoring should be taken into account, which may also be considered as a prognostic factor [28].

The variability found in different studies may be explained by the diagnosis methodology employed, sample preparation, the different values of cut-off points to consider the results as positive and the location of receptors and the lesion area size [73].

No association of the HPV-induced association with the estrogen receptor was observed in this study, which can be justified by the low viral activity due to non integration with the genome, as most lesions are low-grade type. However, in the study conducted by Fonseca Moutinho et al. (2004) [26], this receptor was observed in biopsies of women with CIN III or micro-invasive carcinoma.

A viewpoint defended by Webster et al, 2001 shows that these hormones increase the level of apoptosis induced by proteins E6 and E7 of HPV that, in the presence of E2, induce to cell death [77]. However, Au et al. (2007) demonstrated, through a gene that blocks the estrogen receptor and the estrogenic function in the cell, the reduced expression of mRNA E6 and E7, interruption in the cell proliferation and reduced activity of p53 and pRb.

The findings of this study agree with the results presented by other authors [73, 78] who reported small percent of estrogen receptor expression in normal epithelial and in positive HPV lesions.

Regarding the progesterone receptor, a higher expression is observed in biopsies of women with HR-DNA-HPV. As this agent is an essential co-factor for carcinogenesis, progesterone is suggested to allow the development of lesions caused by this virus. However, the progesterone concentration is dependent on the estrogen quantity has been formed and, in tissues that are negative to estrogen receptor, the expression of progesterone was also low. The absence of expression was observed in severer lesions, probably due to the fact that invasive lesions contaminate the subjacent stroma, contributing to negativity. This information agrees with the findings of some researchers [73, 78, 79]. Pater et al, (1990), demonstrated the progesterone action on an oncogenic activation mechanism in cells of rats infected with HPV 16, but, in the presence of estrogen, this effect was not observed [80].

No studies have been found that observed the smoking habit effect on the association of hormone receptors and the presence of cervical lesions. However, this effect is described in breast neoplasias [81, 82]. This study detected a higher expression of this receptor in non-smokers. One question to be taken into account is whether cigarette metabolites would inhibit the receptor expression; however, more studies are required to clarify such finding.

Regarding the oral contraceptive users, the use of combined hormones (estrogen and progesterone) could increase the expression, due to the metabolism with the formation of derivatives that would act on the process, intensifying the viral presence. Estrogen would activate  $\alpha$  and  $\beta$  receptors in intracell system, which in turn stimulate the transcription of specific genes, provoking alterations to: cell adhesion, migration, increase in cell proliferation and resistance to

drugs that would induce to apoptosis [76]. In addition, the exposure of HPV tumoral cells to hormones would promote the expression of viral oncogenes E6 and E7. A study developed by Ruutu et al. (2006), using cell lineages CaSki and SiHa, determined the transcription of mRNA through RT-PCR technique, and did not observe any significant difference in terms of oncogenes E6 and E7. However, regarding the expression of receptors, the authors observed an association of the expression of estrogen- $\alpha$  receptors and oncogenes E6 and E7, from SiHa lineage. For these authors, estrogen and progesterone increase the cell proliferation, making cells vulnerable to mutations during differentiation [70]. In our study, the estrogen receptor did not present any significant association with any tested epidemiologic factor.

Regarding the proliferation, it was noted that progesterone increases the proliferation in tumoral lineages (CaSki and SiHa). However, for estrogens, the proliferation occurs only in lineage SiHa. This fact can be explained by the increased receptor regulation for epidermal growth on the surface of the cells. A probable explanation for the different responses obtained with the lineages is the quantity of present receptors or the genetic mutation characteristic of each cell type [70].

The reduced apoptosis is another factor that contributes to carcinogenesis [70, 83], although some authors have different viewpoints in this aspect [77]. The findings of this study suggest a low expression of estrogen receptors in the fragments that were analyzed, for both LSIL and HSIL.

There are few studies on the effect of other factors such as smoking habit, use of oral contraceptive and sexual behavior in the association between the expression of proliferation or hormone markers with the histological lesion grade or the presence of HPV-DNA. This study emphasizes the importance of establishing the immunohistochemical expression of p16<sup>INK4a</sup> in the

diagnosis and follow-up of potentially active lesions and combine the detection of Ki67 expression to confirm such findings. The association of these studied epidemiologic variables with such markers becomes an important aspect, as there is evidence that some may contribute to the development of these lesions.

---

#### References

- [1] Kalakun L, Bozzeti MC. Evolution of uterine cervical cancer mortality from 1979 to 1998 in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Cad Saude Publica* 2005; **21**(1): 299-309.
- [2]. Zereu M, Zettler CG, Cambruzzi E, Zelmanowicz A. Herpes simplex type 2 and Chlamydia trachomatis in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*, 2007; 105:172-175.
- [3]. Heselmeyer-Haddad K, Sommerfeld K, White NM et al. Genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in Pap smears predicts the development of cervical cancer. *Am J Pathol* 2005; 166:1229-1238.
- [4]. Murphy N, Ring M, Killalea AG et al. P16<sup>INK4A</sup> as a marker for cervical dyskariosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and Thin Prep TM smears. *J.Clin Pathol* 2003; 56: 56-63.
- [5]. Astbury K, Martin CM, Ring M et al. Future molecular aspects of cervical cytology. *Curr Diag Pathol* 2006; 12: 104-113.
- [6]. Tsai JH, Peng YW, Lin LY, Chou MC, Chiou HL. An association between human papillomavirus 16/18 deoxyribonucleic acid in peripheral blood with p16 protein

- expression in neoplastic cervical lesions. *Cancer Detection and Prevention* 2005; 29: 537-543.
- [7]. Villa LL. Biology of genital human papillomaviruses. *Int J Gynecol Obstet* 2006; 94(S1): p. S3-S7.
- [8]. Lorenzatto M, Cauduro S, Bronner C et al. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions?. *Human Pathol* 2005; 36: 1101-1107.
- [9]. Ekalaksnanam T, Pientong C, Sriampom S, Kongyingyones B, Pengsa P, Kleebkaow P, Kritpetcharat.O, Parkin DM. Usefulness of combining testing for p16 protein and human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma screening. *Gynecol Oncol* 2006; 103(1): 62-66.
- [10]. Lambert AP, Anshau.F, Schmitt VM. p<sup>16INK4A</sup> expression in cervical premalignant and malignant lesions. *Experimental and Molecular Pathology* 2006; 80: 192-196.
- [11]. Samama B, Lipsker D, Boehm N. P16 expression in relation to human papillomavirus in anogenital lesions. *Human Pathol*, 2006; 37: 513-519.
- [12]. Queiroz C, Silva TC, Alves VA et al. P16<sup>INK4a</sup> expression as a potential prognostic marker in cervical pré-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res and Pract* 2006; 202: 77-83.
- [13]. Negri G, Moretto G, Menia E et al. Immunocytochemistry of p16INK4a in liquid-based cervicovaginal specimens with modified Papnicolaou counterstaining. *J Clin Pathol* 2007; 59: 827-830.
- [14]. Nakashima R, Fugita.M, Enomoto T et al. Alteration of p16 and p15 genes in human uterine tumours. *Br J of Cancer* 1999; 80(3/4): 458-467.

- [15]. Klaes R, Benner.A, Friedrich T et al. p16<sup>INK4a</sup> immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(11): 1389-1399.
- [16]. Van de Putte G, Kristensen G, Lie AK, Baekelandt M, Holm R. Cyclins and proliferation markers in early squamous cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; 92(1): 40-6.
- [17]. Kanao H, EnomotoT, Ueda Y et al. Correlation between p14<sup>ARF</sup>/p16<sup>INK4A</sup> expression and HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Letters* 2004; 213: 31-37.
- [18]. Volgareva G, Zavalishina.L, Andreeva Y et al. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer* 2004; 4: 58-67.
- [19]. Fernandes MGM, Ferreira FVA, Ferreira SNH et al. MIB-1 and p53 in penile intraepithelial and invasive squamous HPV- related lesions. *Rev Bras de Cancerologia* 2002; 48(1):29-37.
- [20]. Hong MK, Laski WV, Herman BE et al. Expansion of Ki-67 Proliferative compartment correlates with degree of dysplasia in Barrett's Esophagus. *Cancer* 1995; 75(2): 423-429.
- [21]. Junior JE, CavalcanteD, Medeiros FC, Ferreira FVA. Estudo Imunocitoquímico de proliferação celular (MIB-1) em sedimento de fluído peritoneal de endometriose pélvica. *RBAC* 2002; 34(2): 71-73.
- [22]. McCluggage WG, Immunohistochemistry as a diagnostic aid in cervical pathology. *Pathology* 2007; 39(1): 97-111.
- [23]. Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G et al. MIB-1 immunostaining in stage I squamous cervical carcinoma: Relationship with Natural Killer Cell Activity. *Gynecol Oncol* 1995. 58: 28-33.

- [24]. Rousseau M, Franco EL, Villa LL et al. A Cumulative Case - control study of risk factor profiles for oncogenic and nononcogenic cervical human papillomavirus infections. *Ca Epidemiol, Biomarkers & Prev* 2000; 9: 409-476.
- [25]. Moreno V, Bosh FX, Munoz N et al. International Agency for Research on Cancer Multicentric Cervical Cancer Study Group. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002; 359:1085-192.
- [26]. Fonseca-Moutinho JA, Cruz.E, Carvalho L et al. Estrogen receptor, progesterone receptor, and bcl-2 are markers with prognostic significance in CIN III. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14: 911-920.
- [27]. Lacey JV, Brinton.LA, Barnes WA et al. Use of hormone replacement therapy and denocarcinomas and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 149-154.
- [28]. Park JS, Rhyn J, Kim CJ et al. Neoplastic change of squamo-columnar junction in uterine cervix and vaginal epithelium by exogenous estrogen in HPV-18 URR E6/E7 transgenic mice. *Gynecol Onco*, 2003; **89**: 360-368.
- [29]. Mills B. Immunohistochemistry. In: *Laboratory Methods Immunotechnology*. . 1992, Washington: Ed American Registry of Pathology 247-255.
- [30]. Santos RTM, W.A., Kanamura CT, Nanagaki S.& Pinto GA. 1999. , *Procedimentos em Imuno-histoquímica e Hibridização “in situ”*. In: *Manual de Imuno-histoquímica*. 1999, São Paulo: Eds: Alves, V.A.F.; Bacchi, C.E., Vassalo J 229-259. .

- [31]. Bulten J, van der Avoort IM, Melchers WJG et al. p14<sup>ARF</sup> and p16<sup>INK4A</sup>, two products of the same gene, are differently expressed in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 2006; 101:487-494.
- [32]. Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, Glass AG, Rush BB, Scott DR, Cadell DM, Kurman RJ, Manos MM. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis* 1993; 20(5): 274-8.
- [33]. Coutlee F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, Voyer H, Franco E. Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol* 2002; 40(3):902-7.
- [34]. Cuzick J, Terry G, Ho L, Hollingworth T, Anderson M. Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 1994; 69(1): 167-71.
- [35]. Kjaer SK, Chacherian B, van den Brule AJC et al. High-risk Human Papillomavirus is sexually transmitted: Evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 101-106.
- [36]. Karstensen B, Poppelreuther S, Bonin M et al. Gene expression profiles reveal an upregulation of E2F and downregulation of interferon targets by HPV18 but no changes between keratinocytes with integrated or episomal viral genomes. *Virology* 2006; 353(1): 200-9.
- [37]. Hampl M, Wentzensen N, Vinikurova S et al. Comprehensive analysis of 130 multicentric intraepithelial female lower genital tract lesions by HPV typing. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133(4): 235-245.

- [38]. Torres CHS, Aragón MPA, Aristizabal LO. Papilomavirus y Factores asociados a Neoplasia Intraepithelial Cervical de Alto Grado en Cauca, Colombia. *Rev Salud Publica* 2006; **Sup 8**(1):47-58.
- [39]. Malanchi I, Accardi R, Diehl F et al. Human papillomavirus type 16 E6 promotes retinoblastoma protein phosphorylation and cell cycle progression. *J Virol* 2004; 78(24): 13769-78.
- [40]. Wright JD, Li J, Gerhard DS et al. Human papillomavirus type and tobacco use as predictors of survival in early stage cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2005; 98: 84-91.
- [41]. Bosch FX, de San José S, The Epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers* 2007; 23(4):213-217.
- [42]. Kruse AJ, Skaland I, Janssen E et al. Quantitative Molecular parameters to identify low-risk and high-risk early CIN lesions: Role of markers of proliferative activity and differentiation and Rb availability. *Int J Gynecol Pathol* 2004; 23: 100-109.
- [43]. Liang J, Mittal KR, Wei JJ, Yee H, Chiriboga L, Shukla P. Utility of p16<sup>NK4a</sup>, CEA, Ki67, P53 and ER/PR in the differential diagnosis of benign, premalignant, and malignant glandular lesions of the uterine cervix and their relationship with Silversberg Scoring System for endocervical glandular. *Int J Gynecol Pathol* 2006; 26: 71-75.
- [44]. Rivoire WA, Corleta HVE, Brum IS, Capp E. *Biologia Molecular do Câncer cervical*. *Rev Bras Saude Mater Infant* 2006. **6**(4).
- [45]. Albrecht V, Chevallier A, Bongain A, Lefebvre JC, Giordanengo V. Immunohistochemical and molecular study of severe cervical dysplasia associated with HPV-83. *Gynecol Oncol*. 2007;. 105(1): 252-5.

- [46]. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998, 153(6): 1741-1748.
- [47]. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. P16<sup>INK4a</sup> Expression correlates with degree of cervical neoplasia: A comparison with Ki-67 expression and detection of High-risk HPV types. *Mod Pathol* 2003; 16(7): 665-673.
- [48]. Longatto Filho A, Utagawa ML, Shirata NK et al. Immunocytochemical expression of p16INK4A and Ki-67 in cytologically negative and equivocal pap smears positive for oncogenic human papillomavirus. *Int J Gynecol Pathol* 2005; 24:118-123.
- [49]. Munger K, Baldwin A, Edwards KM et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. Review. *J Virol* 2004; 78(21): 11451-11460.
- [50]. Malanchi I, Caldeira S, Krutzfeldt M et al. Identification of a novel activity of human papillomavirus type 16 E6 protein in deregulating the G1/S transition. *Oncogene* 2002; 21(37): 5665-72.
- [51]. Brington LA, Herrero R, Reeve WC, de Britton RC, Gaitan E, Tenorio F. Risk factors for Cervical Cancer by histology. *Gynecol Oncol* 1993; 51:301-306.
- [52]. Chan PKS, Chang AR, Cheung JLK et al. Determinants of cervical Human Papillomavirus infection: Differences between high- and low-oncogenic risk types. *The J of Infect Dis* 2002; 185: 28-35.
- [53]. Juneja A, Sehgal A, Mitra AB, Pandey AA. Survey on a risk factors Associated with cervical Cancer. *Indian J of Cancer* 2003; 40: 15-22.
- [54]. Liu J, Rose B, Huang X et al. Comparative analysis of characteristics of women with cervical cancer in high-versus low incidence regions. *Gynecol Oncol* 2004; 94: 803-810.

- [55]. Rombaldi RI, Serafinni EP, Villa LL et al. Infection with human papillomaviruses of sexual partners of women having cervical intraepithelial neoplasia. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39:177-187.
- [56]. Ferrera A, Velema JP, Fihueroa M et al. Co-factors related to the causal relationship between Human Papillomavirus and invasive cervical cancer in Honduras. *Int J Epidemiol* 2000; 29:817-825.
- [57]. Vaccarella S, Herrero R, Dai M et al. Reproductive factors, Oral Contraceptive Use, and Human Papillomavirus Infection: Pooled Analysis of the IARC HPV prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(11): 2148-53.
- [58]. Lea JS, Coleman R, Kurien A et al. Aberrant p16 methylation is a biomarker for tobacco exposure in cervical squamous cell carcinogenesis. *Am J Obstet Gynecol*, 2004; 190(3): 674-9.
- [59]. Boyle DC, Smith JR, Infection and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 1999; 9(3): 177-186.
- [60]. Wallin KL, Wilund F, Luostarinen T et al. A population-based prospective study of Chlamydia trachomatis infection and cervical carcinoma. *Int J Cancer* 2002; 101: 371-374.
- [61]. Castellsagué X, Bosh FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 2002; 89: 191-199.
- [62]. Samoff E, Koumans EH, Markowitz LE, Sternberg M et al. Association of Chlamydia trachomatis with persistence of high-risk types of human papillomavirus in a cohort of female adolescents. *Am J Epidemiol*, 2005. 162(7): 668-75.

- [63]. da Costa RF, de Souza JA. *Trichomonas vaginalis* perturbs the junctional complex in epithelial cells. *Cell Res* 2005; 15(9): 704-16.
- [64]. Shew ML, Fortenberry JD, Tu W et al. Association of condom use, sexual behaviors, and sexually transmitted infections with the duration of genital human papillomavirus infection among adolescent women. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2006; 160(2): 151-6.
- [65]. Kanjanavirojkul N, Pairojkul C, Yuenyao P, Patarapadungkit N. Risk factors and histological outcome of abnormal cervix with human papilloma infection in northeastern Thai-women. *Asian Pac J Cancer Prev* 2006; 7(4): 567-570.
- [66]. Keating JT, Cviko A., Riethdorf S et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(7): 884-91.
- [67]. Sarian LO, Derchain SF, Yoshida A et al. Expression of cyclooxygenase - (COX-2) and Ki67 as relates to disease severity and HPV detection in squamous lesions of the cervix. *Gynecol Oncol* 2006; 102(3): 537-41.
- [68]. Koyamatsu Y, Yokoyama M, Nakao Y et al. A comparative analysis of human papillomavirus types 16 and 18 and expressing of p53 gene and Ki-67 in cervical, vaginal, and vulvar carcinomas. *Gynecol Oncol* 2003; 90: 547-551.
- [69]. Brabin LA. Interactions of the female hormonal environment, susceptibility to viral infections, and disease progression. *Aids Patient Care and STDs* 2002; 16(5): 211-221.
- [70]. Ruutu M, Wahlroos N, Syrjänen K, Johansson S, Syrjänen S. Effects of 17 beta-estradiol and progesterone on transcription of human papillomavirus 16 E6/E7 oncogenes in CaSki and SiHa cell lines. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 1261-1268.

- [71]. Svare EL, Kjaer HL, Poll P, Tjong-A-Hung SP, Sschemper J. Risk factors for HPV Detection in Archival Pap smears. , A population-based study from Greenland and Denmark. *Eur J Cancer* 1998; 34(8): 1230-1234.
- [72]. Munoz N, Franseschi S, Bosetti C et al. International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*, 2002; 359(9312): 1093-101.
- [73]. Coelho FRG, Prado JCM, Pereira Sobrinho JS et al. Estrogen and Progesterone receptors in human papillomavirus cervical neoplasia. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 83-88.
- [74]. Robertson DI, Paslawski.D, Duggan MA, Stuart nGC, Nation JG. Estrogen and progesterone receptor, human papillomavirus, and DNA ploidy analysis in invasive carcinoma of the cervix in pregnancy. *Am J Clin Pathol* 1993; 100(1): 18-21.
- [75]. Gonzalez Sanches JL, Chavez Brambila.J, Maricela Roman A, Infante Martinez R, Salazar Esquivel LE. Value of estrogen and progesterone receptors in the management of intraepithelial squamous lesions of low grade. *Gynecol Obstet Mex*, 2001; 69: 1-5.
- [76]. Au WW, Abdou-Salama.S, Al-Hendy A. Inhibition of growth of cervical cancer cells using a dominant negative estrogen receptor gene. *Gynecol Oncol* 2007; 104: 276-280.
- [77]. Webster K, TaylorA, Gaston K. Oestrogen and progesterone increase the levels of apoptosis induced by the human papillomavirus type 16 E2 and E7 proteins. *J Gen Virol* 2001; 82: 201-213.
- [78]. Bekkers RL, van de Avoort.IA, Melchers WJ, Bulten J, de Wide PC, Massuger LF. Down regulation of estrogen expression in an early event in human papillomavirus infected cervical dysplasia. *Eur J Gynecol Oncol* 2005; 26(4): 376-382.

- [79]. Horn LC, Richter.CE, Einkenkel J et al. p16, p14, p53, cyclin D1, and steroid hormone receptor expression and human papillomaviruses analysis in primary squamous cell carcinoma of the endometrium. *Ann Diagn Pathol* 2006; 10(4): 193-6.
- [80]. Pater A, Bayatpour.M, Pater MM. Oncogenic transformation by human papillomavirus type 16 deoxyribonucleic acid in the presence of progesterone or progestions from oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162: 1099-103.
- [81]. Terry PD, Rohan.TE. Cigarette smoking and the risk of breast cancer in women: a review of the literature. Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(10 Pt1): 953-71.
- [82]. Manjer J, Malina.J, Berglund G, Bondeson L, Garne JP, Janzon L. Smoking associated with hormone receptor negative breast cancer. *Int J Cancer* 2001; 91(4): 580-4.
- [83]. Wang Q, Li X, Wang L, Feng YH, Zeng R, Gorodeski G. Anti-apoptotic effects of estrogen in normal and cancer cervical epithelial cells. *Endocrinology* 2004; 145: 5568-5579.

**Artigo 2: “CO-INFECÇÃO de *Chlamydia trachomatis*(CT) e *Papilomavírus humano* (HPV): ASSOCIAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE p16<sup>INK4a</sup> e Ki67 EM BIÓPSIAS DE PACIENTES COM E SEM LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS**

**Mylius LC<sup>1,2</sup>; Igansi CN<sup>3</sup>; Meurer L<sup>4</sup>; Edelweiss MIA<sup>1,3</sup>; Bozzetti MC<sup>1,4</sup>**

1. Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas, 2.Faculdade de Farmácia, 3.Programa de Pós graduação em Epidemiologia, 4.Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Fonte Financiadora: Fipe, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS- Brasil**

**Sex Trans Dis**

**RESUMO:**

**Objetivos:** Identificar a frequência de co-infecção por Papilomavírus humano (HPV) e *Chlamydia trachomatis* (CT) em lesões cervicais e relacionar com a expressão imuno-histoquímica de p16<sup>INK4a</sup> e Ki67.

**Métodos:** Estudo transversal com 86 mulheres atendidas em uma unidade de atenção primária à saúde da cidade de Porto Alegre-RS, Brasil. Um raspado cervical foi coletado para pesquisa de DNA-HPV e DNA-CT, através da técnica da Reação em cadeia da Polimerase (PCR), bem como para pesquisa de tipos oncogênicos de HPV. Análise imuno-histoquímica foi realizada no tecido cervical de biópsia para identificar a expressão dos marcadores do ciclo celular p16<sup>INK4a</sup> e Ki67.

**Resultados:** As mulheres positivas para DNA-HPV tinham, em média,  $37,4 \pm 1,8$  anos e aquelas que apresentavam co-infecção,  $37,3 \pm 3,6$  anos. Em torno de 83,0% e 19,0% eram positivas para DNA-HPV e DNA-CT, respectivamente. Todas as mulheres positivas para DNA-CT foram positivas para DNA-HPV. Entre as portadoras de co-infecção, 56,0% expressaram a p16<sup>INK4a</sup> (R=0,51, IC95%: 0,17-1,57). Houve uma associação estatisticamente significativa entre o grau histológico da lesão e a expressão de Ki67. Todas as lesões de alto grau, 50,0% das lesões de baixo grau e 31,0% das biópsias negativas expressaram Ki67 ( $p=0,004$ ). Um total de 37,0% das mulheres com co-infecção e 29,0% das mulheres sem co-infecção expressaram ambos os marcadores.

**Conclusão:** Embora mais da metade das portadoras de co-infecção tenha expressado a p16<sup>INK4a</sup> e mais de um terço tenha expressado ambos os marcadores estudados, os resultados sugerem ausência de associação entre estas variáveis. No entanto, mais estudos envolvendo uma amostragem maior são necessários para corroborar estes achados.

### ***Introdução:***

O câncer cervical invasivo é precedido por um espectro de anormalidades progressivas no epitélio, como a neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) nos diferentes graus histológicos.<sup>1</sup>

A infecção genital persistente pelo *Papilomavírus humano* (HPV) é decisiva na etiologia do câncer cervical sendo mais comum entre as mulheres jovens e sexualmente ativas.<sup>2</sup> As estimativas de indivíduos sexualmente ativos que entram em contato com este vírus variam de 5,0% até 80,0%, os quais são suscetíveis a desenvolver infecção ao longo da vida.<sup>3</sup>

Outros fatores tais como idade, estado marital, idade da primeira relação sexual, número de parceiros sexuais, fumo, uso de hormônios e co-infecções podem influenciar o prognóstico da infecção.<sup>4-6</sup> Outro aspecto a ser considerado são as desigualdades sociais que contribuem para limitar o acesso a medidas de prevenção eficazes como o rastreamento periódico e a vacinação.<sup>7,8</sup>

Um estudo realizado em 2006, no Rio de Janeiro, Brasil, comparou mulheres atendidas em serviço de saúde privado e público. Foi observado que diagnósticos negativos e lesões benignas foram mais frequentes no serviço de saúde privado e lesões malignas nas pacientes

atendidas no serviço público. Neste último grupo, também foram mais prevalentes em mulheres com citologia normal, porém infectadas pelo HPV, sugerindo maior exposição. <sup>8</sup>

A co-infecção bacteriana por *Chlamydia trachomatis* (CT) em mulheres com história de infecção pelo HPV tem sido estudada como um potencial fator contribuinte para o desenvolvimento de neoplasias e câncer cervical. Entretanto, alguns autores têm sugerido que a infecção prévia por CT está associada a um risco elevado de desenvolver a doença, já outros, não observaram esta associação. <sup>9-12</sup> Alguns estudos sugerem que esta associação é negativa somente em casos de adenocarcinoma. <sup>13-14</sup> Outros autores também sugerem a presença de associação entre a presença de CT e o carcinoma cervical. <sup>15-17</sup>

Em um estudo publicado em 2002, autores acompanharam durante 26 anos uma coorte de 118 mulheres que desenvolveram câncer depois de realizado um exame preventivo em média, 5 a 6 anos antes, comparando com um grupo que permaneceu com exame normal. <sup>9</sup> Os autores verificaram, através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), a presença do DNA-HPV e DNA-CT, sendo que a presença de CT foi relatada em 8,0% das pacientes com câncer. Este resultado mostrou um risco relativo de 17.1 (IC95% 2,6-infinito) das pacientes com co-infecção por HPV e CT. <sup>9</sup>

P16<sup>INK4a</sup> é um inibidor da quinase dependente de ciclina (CDK) que desacelera o ciclo celular por controlar a expressão do fator de transcrição E2F. A infecção por HPV de alto grau está envolvida na carcinogênese e a integração do HPV no genoma humano resulta na superexpressão das oncoproteínas virais E6 e E7. <sup>18</sup> A proteína E6 se liga à proteína supressora tumoral p53 e resulta na degradação e subsequente perda da integridade genética. <sup>19</sup> A proteína E7 dos HPVs interage com a proteína do retinoblastoma (pRb) e neutraliza a função das proteínas

deste grupo, resultando na liberação do fator de transcrição E2F do complexo pRb-E2F. O acúmulo de E2F também leva à indução da atividade da p16<sup>INK4A</sup>.<sup>20,21</sup>

Em estudo conduzido por Benevollo e cols. em 2006, os resultados obtidos demonstraram que nenhum dos tecidos cervicais negativos, avaliados por imuno-histoquímica, apresentou positividade para p16<sup>INK4a</sup>, enquanto que houve um aumento constante e significativo na positividade deste marcador de acordo com o grau histológico, sendo 31,0% nas lesões NIC I, 90,0% nas NIC II e 100,0% nas NIC III e carcinomas ( $p < 0.0001$ ). Assim, a superexpressão de p16<sup>INK4a</sup> consistentemente, parece indicar elevada sensibilidade (84,0%) e especificidade (98,0%) em detectar HPV de alto risco com elevado valor preditivo positivo (97,0%) e valor preditivo negativo (86,0%).

O anticorpo monoclonal Ki67 reage com uma proteína nuclear não-histona que é expressa em núcleo de células em proliferação em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0 e na fase precoce de G1.<sup>23,24</sup> Vários estudos imuno-histoquímicos com este anticorpo têm demonstrado uma associação entre este marcador, o grau histológico e a evolução tumoral, sugerindo que a expressão de Ki67 se apresenta como um exame útil na informação do prognóstico em doenças do tecido conectivo, em desordens linfoproliferativas, e em alguns carcinomas.<sup>23</sup>

Células na camada superficial do epitélio normal são geralmente quiescentes e não expressam Ki67, enquanto células da camada basal geralmente expressam, devido à característica proliferativa funcional desta camada.<sup>25</sup> Alguns autores tem demonstrado uma relação entre Ki67 e a severidade da lesão ou a taxa de crescimento, e sua aplicabilidade em estudo de lesão vulvar e vaginal causadas pelo HPV.<sup>25-28</sup> Portanto, a determinação de Ki67 parece ser um exame adicional e complementar relevante na detecção e distinção de diferentes graus de lesões na cérvix uterina.

Sabe-se que o HPV de alto risco, através de oncoproteínas, pode depletar a ação de proteínas supressoras como a p53 e pRb, causando a super-expressão dos inibidores de CDKs.<sup>29</sup> No entanto, em pacientes co-infectadas (HPV/CT), este efeito ainda não foi estudado.

Conhecer possíveis fatores adicionais que possam influenciar a evolução da infecção pelo HPV e identificar potenciais marcadores para estas associações justifica a necessidade de estudá-las para que medidas de prevenção, diagnóstico e tratamento possam ser planejadas. Assim, este estudo teve como objetivos verificar a expressão imuno-histoquímica de p16<sup>INK4a</sup> e Ki67 em mulheres positivas para DNA-HPV e ou DNA-CT em mulheres atendidas em um serviço de atenção primária em Porto Alegre, no sul do Brasil.

### ***População do Estudo***

Trata-se de um estudo transversal que arrolou 86 mulheres oriundas de um serviço de atenção primária, selecionadas a partir de participantes de um estudo de coorte iniciado em fevereiro de 2003. Foram incluídas nesta amostra mulheres que realizaram exames para DNA-HPV/DNA-CT e que foram submetidas à biópsia de colo uterino para análise histopatológica.

### ***Métodos***

#### ***Pesquisa de DNA-HPV e DNA-CT***

A pesquisa de DNA-HPV e de DNA-CT foi realizada a partir de amostras de colo uterino coletadas de todas as mulheres estudadas, através da técnica de PCR.

#### ***Extração de DNA-HPV e DNA-CT***

A extração de DNA das amostras de lavado cérvico-vaginal foi realizada de acordo com o protocolo de Proteinase K.<sup>30</sup>

A amplificação foi direcionada para o gene L1 e os *primers* empregados foram My09 e My11. As condições da PCR foram descritas por Bauer *et al* (1993) e Coutlée F *et al* (2002).<sup>31,32</sup>

DNA-CT, a técnica foi padronizada por Becker D (2005) <sup>33</sup>, utilizando-se os *primers* CTP1 e CTP2 que amplificam um segmento de 201pb da ORF de número 4 do plasmídio críptico de CT. Este segmento localiza-se a 2940pb do sítio único de restrição de BamHI:

CTP1 5'...TAGTAACTGCCACTTCATCA...3'

CTP2 5'...TTCCCCTTGTAATTCGTTGC...3'

Para o controle das reações de PCR, foi ensaiado para cada amostra clínica, um controle positivo de reação, que consistiu em um fragmento de 450pb correspondente às células Caski e SiHa (células infectadas com o vírus HPV), um fragmento de 201pb correspondente às células infectadas por CT e um controle negativo de reação sem a presença de qualquer. Tanto para o PCR de HPV quanto para o de CT, foram realizados PCR multiplex utilizando primers específicos para cada microorganismo, e primers complementares ao gene da  $\beta$ -globina humana (gH20 e PC04) [32]. Os primers de  $\beta$ -globina foram empregados nestas reações para verificar a viabilidade do DNA testado.

### ***Pesquisa dos tipos oncogênicos mais freqüentes***

Todas as amostras positivas na triagem DNA-HPV foram tipadas para HPV de alto risco (HPV-AR) (-16, -18 e -31), utilizando-se *primers* específicos correspondentes à região E6 e E7 do genoma viral. As condições de amplificação e os *primers* utilizados estão baseados em metodologia descrita por Cuzick *et al* (1994) <sup>34</sup> (Tabela 1):

Tabela 1: *Primers* e condições de amplificação por PCR

<b>Tipos Virais</b>	<b>Seqüências</b>	<b>Ta<sup>a</sup> (°C)</b>
<b>HPV-16</b>	5'...GC GAT CCT GTC TGC TTT TAT ACT AA...3' (sense)	54°C
	5'...AAG GCC AAC TAA ATG TCA C...3' (antisense)	

<b>HPV-18</b>	5'...TGC AGC ACG AAT GGC ACTGGC CTG...3' (sense)	70°C
	5'...CAC GGC GAC CCT ACA AGC TAC CTG...3' (antisense)	
<b>HPV-31</b>	31A 5'...TACCTGTGTTTCTGTAAAC...3' (sense)	52°C
	31S 5'...AGAAAGACCTCGGAAATTG...3' (antissense)	

<sup>a</sup>**Temperatura de Anelamento**

**Fonte:** Cuzick *et al* (1994) <sup>34</sup>

***Biópsias***

Lâminas foram preparadas a partir dos blocos de parafina de biópsias. Estas foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina para a classificação histológica, conforme critérios de Richardt <sup>35</sup>, modificadas neste trabalho para LSIL, HSIL. <sup>36,37</sup> Na categoria LSIL, foram incluídos os resultados com diagnóstico de NIC1 e na categoria HSIL, os achados com diagnóstico de NIC 2 e 3. O diagnóstico de ausência de alterações neoplásicas foi feito quando não se observava nenhuma alteração, e se enquadravam aqui, os diagnósticos de metaplasia escamosa e /ou inflamação crônica diagnóstico de ausência de alterações. Posteriormente, os casos foram revisados por duas patologistas treinadas (MIE e LM) do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), RS-Brasil.

***Imuno-histoquímica***

Amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina foram realizados cortes de 4 micrômetros, foram desparafinizadas em xileno, seguidas de rehidratação. A recuperação antigênica foi feita em tampão citrato pH 6,0 e, posteriormente levadas a microondas por 20 minutos. Os cortes foram deixados em temperatura ambiente e lavados com tampão fosfato três vezes por 5 minutos cada. Após o bloqueio da peroxidase, os cortes foram re-hidratados e as lâminas foram submetidas ao processo de imuno-histoquímica. <sup>38,39</sup>

Os anticorpos empregados foram p16<sup>INK4a</sup>, Neomarkers, CA, USA, clone 16P07 na diluição de 1:75 e anti-Ki67, DAKO, Glostrup, Denmark, clone MIB-1, na diluição de 1:30.

A intensidade de expressão para p16<sup>INK4a</sup> nas lesões intra-epiteliais escamosas foi graduados conforme Bulten *et al* (2006)<sup>20</sup>: negativo (-) se nenhuma das células expressaram coloração, positivo (+, fraco) se o percentual de células que expressaram variou de 1-25,0%, (++ , moderado) se o percentual variou de 26-75,0% e (+++, forte) se mais de 75,0% das células foram coradas, tanto no citoplasma quanto no núcleo. O padrão de expressão das células foi dividido em focal se a expressão estava concentrada em algumas áreas e, difuso se a expressão estava distribuída por toda a lâmina.

O Ki67 foi considerado positivo se o núcleo das células apresentasse coloração marrom. Em todas as amostras de 100 a 200 células foram contadas e, os resultados foram expressos em percentual. Todas as amostras foram avaliadas por duas patologistas (MIE e LM) e, quando necessário, era estabelecido um consenso.

### ***Variáveis do Estudo***

Os desfechos do estudo foram a infecção genital pelo HPV e/ou pela CT e o diagnóstico histopatológico das lesões do colo uterino. A expressão de p16<sup>INK4a</sup> e Ki67 foram relacionadas com estes desfechos. As variáveis independentes estudadas incluem dados demográficos, de comportamentos sexuais, reprodutivos e morbidades pregressas.

### ***Controle de Qualidade dos dados***

As informações foram armazenadas em uma base de dados com digitação dupla, sendo que 20,0% dos questionários foram selecionados, de forma aleatória, e contrastados com os originais. Possíveis erros e incongruências observados foram corrigidos.

### ***Análise Estatística***

Para a comparação das variáveis categóricas utilizou-se o teste Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher, quando indicado. As variáveis contínuas foram analisadas através do teste *t de Student* e ANOVA. Os achados com valor de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Para a análise dos dados foi utilizado o programa SPSS® versão 13.0

### **Resultados**

#### ***PCR para HPV e CT***

Foram analisadas 86 pacientes, sendo que destas aproximadamente 83,0% (71/86) eram positivas para DNA-HPV e 19,0% (16/86) para DNA-CT. Todas as mulheres positivas para DNA-CT, também foram positivas para DNA-HPV ( $p=0,06$ ). Em torno de 40,0% (34/86) foram positivas para HPV-AR, sendo que destas, 37,0% (6/34) eram positivas para DNA-CT. O HPV-AR mais freqüente foi HPV-16 (50,0%), seguido pelo HPV-31 (38,0%) e HPV 18(12,0%).

A média de idade das pacientes positivas para DNA-HPV foi de  $37,4 \pm 1,8$  anos e para aquelas que apresentavam co-infecção, de  $37,3 \pm 3,6$  anos.

Na tabela 2 estão descritas as características das mulheres que apresentaram co-infecção (DNA-HPV e DNA-CT). Observa-se uma associação estatisticamente significativa desta co-infecção com o grau de escolaridade ( $p= 0,04$ ).

Tabela 2: Características das mulheres com co-infecção por HPV e CT em um grupo de 86 pacientes.

Variáveis	Co-Infecção		Valor p
	Sim N (%)	Não N (%)	
<b>Idade</b> < 35 anos ≥35 anos	07 (44,0) 09 (56,0)	29 (41,0) 41 (59,0)	0,86
<b>Estado Marital</b> Solteira Não Casada	05 (31,0) 11 (69,0)	38 (54,0) 32 (46,0)	0,16
<b>Cor</b> Branca Não-Branca	12 (75,0) 04 (25,0)	59 (84,0) 11 (16,0)	0,46
<b>Escolaridade</b> Até o 1º Grau Incompleto 1º Grau Completo ao 2º Incompleto 2º Grau completo ou mais	02 (12) 09 (56) 05 (32)	22 (32) 17 (24) 31 (44)	<b>0,04</b>
<b>Menarca</b> < 12 anos ≥ 12 anos	05 (31) 11 (69)	19 (27) 51 (73)	0,76
<b>Sexarca</b> ≤ 17 anos 17 a 19 anos 20 anos ou mais	09 (56) 02 (13) 05 (31)	28 (40) 22 (31) 20 (29)	0,34
<b>Nº Parceiros/ vida</b> > 2 parceiros Até 2 parceiros	06 (37) 10 (63)	33 (47) 37 (53)	0,67
<b>Nº de gestações</b> ≤ 3 filhos Mais de 3 filhos	13 (81) 03 (19)	37 (53) 33 (47)	0,07
<b>Idade da 1ª Gestação</b> ≤ 17 anos ≥ 18 anos	05 (31) 11 (69)	14 (20) 56 (80)	0,33
<b>Uso de contraceptivos Oraís (ACO)</b> Sim Não	14 (87) 02 (13)	50 (71) 20 (29)	0,22
<b>Presença de DST</b> Sim Não	14 (87) 02 (13)	44 (63) 26 (37)	0,11
<b>Fumo</b> Sim Não	02 (13,0) 14 (87,0)	19 (27,0) 51 (73,0)	0,34

Não foi observada associação estatisticamente significativa entre o grau da lesão a presença de co-infecção ( $p=0,75$ ) (Tabela 3).

Tabela 3. Características anatomopatológicas das pacientes com co-infecção

Anatomopatológico	Co-Infecção (HPV/CT)		<i>p</i> *
	Sim	Não	
HSIL	01 (16,7%)	05 (83,3%)	
LSIL	11 (22,0%)	39 (78,0%)	<i>p</i> =0,75
Normais	04 (13,3%)	26 (86,7%)	

\* valor de *p* para o teste  $\chi^2$  de Pearson

Na análise imuno-histoquímica verificou-se que entre as 86 pacientes avaliadas, 56,0% das portadoras de co-infecção expressaram a p16<sup>INK4a</sup> (*p*=0,38; OR=0,51, IC95%: 0,17-1,57). Na presença de co-infecção, a expressão de p16<sup>INK4a</sup> foi de moderada a forte em aproximadamente 37,0% e o padrão de expressão foi difuso em 50,0%. Nas biópsias positivas para DNA-HPV, 78,0% expressaram esta proteína, sendo que a expressão foi de moderada a forte em 54,0% dos casos e o padrão foi difuso em 56,0%. Quanto à análise anatomopatológica, 83,0% das lesões de alto grau expressaram a p16<sup>INK4a</sup>. Entre as lesões de baixo grau e as biópsias negativas, 72,0% e 60,0% expressaram esta proteína, respectivamente (*p*= 0,43).

Em torno de 50,0% (8/16) das mulheres com co-infecção expressaram o anticorpo Ki67. Em mulheres com infecção por HPV, esta expressão foi de 38,0% (*p*=0,73).

Houve uma associação estatisticamente significativa entre o grau histológico da lesão e a expressão de Ki67. Em 100% das lesões de alto grau, 50,0% das lesões de baixo grau e 31,0% das biópsias negativas expressaram Ki67 (*p*=0,004).

Quanto à relação entre os dois marcadores estudados e a co-infecção, observa-se, aproximadamente 37,0% ( $p=0,31$ ) das mulheres com co-infecção e 29,0% ( $p=0,16$ ) das mulheres sem co-infecção expressaram ambos marcadores.

Estimou-se a sensibilidade, especificidade e os valores preditivos positivo e negativo (VPP e VPN) para os marcadores p16<sup>INK4a</sup> e Ki67 em relação ao exame anatomopatológico em pacientes com as duas infecções. Para a p16<sup>INK4a</sup>, a sensibilidade foi de 25,0% (IC95%:0,7-49,30%), a especificidade foi de 72,9% (IC95%: 61,7- 84,0%), VPP de 17,4% (IC95%: 0 - 35%) e VPN foi de 81,0% (IC95%: 70,5-91,40%). Já em relação ao Ki67, verificou-se uma sensibilidade de 50,0% (IC95%:23-78,0%), especificidade de 66,0% (IC95%:54-79,0%), VPP de 25,0% (IC95%:8,4-42,0%) e VPN 85,0% (IC95%:75-96,0 %).

Na tabela 4 descreve-se a distribuição da quantidade de células (%) que expressaram ambos marcadores, p16<sup>INK4a</sup> e Ki67.

Tabela 4: Quantidade de células que expressaram os dois marcadores\*

		p16 <sup>INK4a</sup>			
		Sem expressão	≥ 1 ≤ 10% células	≥ 11 ≤ 50% células	≥51% células
<b>Ki67</b>	Positivo	06 (18,7)	0 (0,0%)	04 (12,5%)	22 (68,8%)
	Negativo	20 (37,0%)	04 (7,4%)	12 (21,25%)	18 (33,4%)

\* valor de  $p = 0,01$  para a associação (Teste Exato de Fisher)

### Discussão

Estudos têm demonstrado que o HPV é fator necessário para o desenvolvimento de lesões precursoras e câncer cervical, entretanto co-fatores, tais como, uso de anticoncepcionais orais,

outros hormônios, paridade, fumo e exposição prévia a outros agentes sexuais, entre eles, *Clamidia trachomatis* e herpes simplex vírus 2, têm sido citados.<sup>14,39,40</sup>

CT é um agente obrigatoriamente intracelular que infecta as células epiteliais do trato genital e tecido ocular. É uma das patologias mais comuns do mundo com 89 milhões de casos novos/ano. Embora freqüentemente seja uma infecção assintomática, é considerada causa de morbidade em mulheres sexualmente ativas, causando seqüelas severas como doença inflamatória pélvica, gravidez ectópica e infertilidade tubária. Está associada também com hipertrofia e indução de metaplasia, supondo-se que possa ter algum papel na etiologia do câncer cervical.<sup>39,41</sup>

Existem evidências também, de que mulheres contaminadas por HPV apresentam um maior risco de adquirir outra infecção, como a causada por CT.<sup>9,42</sup> No presente estudo, a freqüência de infecção pelo HPV foi de 83,0% e de infecção por CT, 19,0%. Este percentual foi elevado, se comparado ao resultado de outros estudos, possivelmente pelo fato de ser uma amostra com maior probabilidade de se verificar mulheres positivas, já que todas realizaram biópsia após terem sido observadas alterações ao exame colposcópico.<sup>43,44</sup> Com relação ao estudo desenvolvido por Denks *et al.* (2007)<sup>43</sup>, e verificada uma prevalência de 8,0% de infecção por CT e uma associação significativa desta infecção com os tipos virais de alto risco testados (OR=2.5,  $p<0.005$ ), em especial em mulheres com 41 anos ou mais. Já o estudo de Petersen *et al.* (2007)<sup>42</sup>, das 581 mulheres arroladas em uma clínica colposcópica, e dados de 560 foram avaliados por colposcopia e biópsia (98,0%). Observou-se uma razão de chance de infecção para *C. trachomatis* de 2,1% (IC 95%:1,5-2,7). Neste mesmo estudo, estratificando para a idade, em pacientes com 25 anos ou menos, este valor sobe para 5,8% (IC95%: 3,8-7,8) e, em mulheres mais velhas, este é de apenas 0,9% (IC 95%: 0.4-1.4%).

A escolaridade, em nosso estudo, se mostrou significativamente associada à co-infecção. Este fato pode sugerir que a escolaridade possa interferir no grau de conhecimento sobre fatores de risco, exposição e de informações sobre formas de prevenção. De Lucca *et al* (2006)<sup>39</sup> comentam uma associação da presença de infecção por CT e o baixo nível sócio-econômico (32,9%) das pacientes em relação aquelas de nível sócio-econômico médio ou alto (15,7%) das mesmas. Observou também, um maior risco de infecção nas pacientes infectadas pelo vírus do HPV, com diferença estatisticamente significativa ( $p=0,016$ ). Em relação aos tipos virais testados, nossos resultados indicam o HPV-16 como o tipo viral de alto risco mais freqüente, corroborando com achados de outros estudos.<sup>12, 39, 44</sup>

Estudo desenvolvido em 5328 mulheres entre 15-44 anos em oito países apresentou uma prevalência de 0,2% de infecção por CT (IC95%: 0,0-0,7%) na Espanha e de 5,6% (IC95% 3,4-7,8%) na Nigéria, sendo maior na faixa etária de 15-24 anos (4,5, IC95%: 3,4-8,0%) do que na faixa etária de 25-44 anos (2,6, IC95%: 2,1-3,1). Pesquisadores acreditam que estes dados de prevalência são baixos, não expressando os achados em mulheres de alto risco.<sup>45</sup>

Sabe-se que a infecção por HPV causa alterações citológicas compatíveis com lesão de baixo grau ou alterações mais graves. Em Minas Gerais, Brasil, de Paula *et al.* (2007)<sup>11</sup> investigaram a presença de DNA-CT e DNA-HPV em 250 amostras cérvico-vaginais de pacientes normais ou com alterações citológicas. Destas, 70,0% eram negativas, 40,0% (100/250) portadoras de DNA-HPV e 5,2% (13/250) positivas para CT. Das amostras positivas para citologia, o DNA-HPV foi detectado em 73,3% dos casos e DNA-CT em 9,3%. A maior taxa de co-infecção, 15,4%, foi verificada nas amostras portadoras de ASC-US/AG-US. Uma associação ocorreu entre a infecção por HPV e as alterações citológicas, entretanto, para casos de infecção por CT ou co-infecção, esta associação não foi observada. Considerando este fato e relacionando

aos resultados encontrados neste estudo, pode-se inferir que a associação não foi verificada em virtude do baixo número de casos de CT encontrados. Entretanto, observa-se que apenas 4/16 (25,0%) dos casos apresentaram co-infecção e anatomopatológico normal.

Um estudo de caso-controle aninhado a uma coorte envolvendo 13.595 mulheres que teve início em 1991 com seguimento de nove anos detectou a presença de anticorpos séricos de HPV-6, -16, -18 e de CT. Foram incluídos 114 casos, sendo 72 incidentes e 42 prevalentes no momento da entrada do estudo. A soro positividade para HPV-16 foi associada com câncer cervical (OR=6,33, IC95%: 3,45-11,62). De um modo geral, a infecção por CT não se apresentou associada com o câncer cervical; no entanto, quando se avalia o caso incidente, esta associação aparece (OR=2,94, IC95%: 1,16-8,47).<sup>47</sup> No trabalho desenvolvido por de Paula *et al.* (2007)<sup>11</sup> também não foi verificada associação entre lesões cervicais e a infecção por CT ou pela co-infecção CT e HPV.

Já, Madeleine *et al.* (2007)<sup>13</sup> verificaram uma associação significativa entre o risco de carcinoma cervical e a presença de anticorpos contra CT, independente do tipo de HPV. Em relação aos sorotipos testados, 6/10 apresentaram associação: sorotipo B (OR=3,6; IC95%:1,5-8,4), sorotipo D (OR=2,1; IC95%: 1,2-3,5), sorotipo E (OR=2,4; IC95%:1,4-3,9), sorotipo G (OR=3,0; IC95%:1,1-7,9), sorotipo I (OR= 4,2; IC95%: 1,5-11,7), e sorotipo J (OR=2,3; IC95%: 1,0-5,1). Os sorotipos C, F, H e K não estiveram associados e apresentaram baixa prevalência na população.

Em estudo que analisou a presença de HPV-DNA e a presença de co-infecção com Herpes vírus tipo 2 (HSV-2) e CT em neoplasia intraepitelial vulvar (VIN) e em tecido normal, o HPV-DNA esteve presente em 75,6% dos casos, sendo 73,0% destes, HPV-16. No grupo controle, o HPV foi detectado em apenas 1 caso (2,4%). No grupo estudado, dos 41 casos de

VIN, o HSV-2 foi encontrado em 6/41 casos (14,6%), não diferindo do grupo controle. A infecção bacteriana por CT foi encontrada também em 6/41 casos (14,6%) no grupo estudado e, em 9,7% (4/41) casos no grupo controle. A relação entre co-infecção por HPV e HSV-2, bem como HPV e CT, não apresentaram correlação neste estudo.<sup>12</sup> Entretanto, Finnan *et al.* (2006)<sup>44</sup> detectaram uma prevalência elevada de CT, HSV-1 e HSV-2 em amostras HPV positivas. HPV-AR e a co-infecção HPV/CT e HPV/HSV-1, mas não HSV-2, estiveram associados com maior risco de câncer cervical.

A expressão do inibidor da quinase dependente de ciclina p16<sup>INK4a</sup> tem sido citada em pesquisas como marcador promissor das lesões HPV-AR induzidas. No entanto, estudos verificando se a expressão deste marcador está aumentada em casos de co-infecção por CT não foi estudada. A expressão de p16<sup>INK4a</sup> pode ser avaliada quanto ao percentual de células que expressam, pelo padrão de expressão e através da intensidade de expressão. Nas pacientes portadoras de HPV observou-se que 78,2% expressaram a proteína, sendo que a intensidade foi moderada à forte em 54,5% dos casos e o padrão difuso em 56,4%, conforme esperado. A p16<sup>INK4a</sup> esteve superexpressa pela interação da oncoproteína E7 do HPV-AR e a pRb, resultando na liberação do fator de transcrição E2F. Esta interação é análoga a fosforilação mediada pelas CDKs, resultando no acúmulo do inibidor, p16<sup>INK4a</sup>.<sup>47</sup> Entretanto, nas pacientes portadoras de co-infecção em nosso estudo, a expressão de p16<sup>INK4a</sup> foi de 56,3% e não apresentou associação significativa ( $p=0,23$ ). A expressão se apresentou de moderada à forte em 37,5% dos casos, sendo o padrão difuso em 50,0%, não diferindo estatisticamente daquelas causadas pela presença de DNA-HPV.

Ki67 é um antígeno de proliferação que tem sido relacionado à carcinogênese em diferentes tipos tumorais.<sup>48,49</sup> Infecções por HPV-AR e alterações no ciclo celular com maior

expressão de Ki67 tem sido citados.<sup>25, 26, 28, 50</sup> A infecção por CT tem sido sugerida como fator de risco para HPV e, conseqüentemente para carcinogênese.<sup>9, 40, 47</sup> Verificar se a co-infecção aumenta a proliferação, através da determinação de Ki67 em relação à infecção causada pelo HPV foi proposta neste estudo, uma vez que não se encontrou na literatura, estudos que verificassem esta associação. No presente estudo, o Ki67 foi expresso em 50,0% dos casos de co-infecção e em 34,0% dos casos positivos para DNA-HPV.

Através desta análise imuno-histoquímica pretendíamos averiguar se algum destes marcadores, ou a combinação dos dois poderia sugerir uma maior associação nas pacientes portadoras de co-infecção, entretanto este achado não foi encontrado. Verificou-se que não houve diferença significativa na expressão de p16<sup>INK4a</sup> e Ki67 nas pacientes portadoras de co-infecção, em relação à positividade para DNA-HPV. Da mesma forma que os resultados observados por Fehér & Szalmáz (2006) e Zereu *et al.* (2007), nossos achados sugerem que a presença de CT não parece ser um fator associado a carcinogênese em colo uterino, se considerarmos os dados obtidos nesta análise imuno-histoquímica.<sup>14,51</sup>

Assim, embora mais da metade das portadoras de co-infecção tenha expressado a p16<sup>INK4a</sup> e mais de um terço tenha expressado ambos os marcadores estudados, os resultados mostram ausência de associação entre estas variáveis. No entanto, mais estudos envolvendo uma amostragem maior são necessários para corroborar de forma mais conclusiva estes achados.

## ***Referências***

1. Park JS, Rhyn.JW, Kim CJ, et al. Neoplastic change of squamo-columnar junction in uterine cervix and vaginal epithelium by exogenous estrogen in HPV-18 URR E6/E7 transgenic mice. *Ginecol Oncol* 2003; 89: 360-368.
2. Sijvarger CC, González JV, Prieto A, et al. Cervical infection epidemiology of human papillomavirus in Ushuaia, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2006; 38(1): 19-24.
3. Weaver BA. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. *J Am Osteopath Assoc.*, 2006. 106 (3) (Suppl1): p. S2-8. Review.
4. Ferrera A, Velema J, Figueroa M, et al. Co-factors related to the causal relationship between human papillomavirus and invasive cervical cancer. *Int Journal of Epidemiol* 2000; **29**: 817-825.
5. Wright JD, Li J, Gerhard DS, et al. Human papillomavirus type and tobacco use as predictors of survival in early stage cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2005; **98**(1): 84-91.
6. Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, et al. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* 2006; **24S3**: p. S3/52-S3/61.
7. Goldie S. A public health approach to cervical cancer control: Considerations of screening and vaccination strategies. *Int J Gynecol Obstetr* 2006; **94**(suppl 1): S95-S105.
8. Oliveira LHS, Rosa MLG, Pereira CRN, et al. Human Papillomavirus status and cervical abnormalities in women from public and private health care in Rio de Janeiro state, Brazil. *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 2006; **48**(5): 279-285.

9. Wallin KL, Wiklund F, Luostarinen T, *et al.* A population-based prospective study of *Chlamydia trachomatis* infection and cervical cancer carcinoma. *Int J Cancer*, 2002; 101(4): 371-374.
10. Smith JS, Bosetti C, Munoz N, *et al.* *Chlamydia trachomatis* and invasive cervical cancer: A pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int J Cancer* 2004; 111(3): 431-439.
11. De Paula FD, Fernandes AP, Carmo BB, *et al.* Molecular detection of *Chlamydia trachomatis* and HPV infections in cervical samples with normal and abnormal cytopathological findings. *Diagn Cytopathol* 2007; 35(4): 198-202.
12. Kwasniewska A, K.E., Visconti J, Zdunek M, Szymaniski M, Gozdzicka-Jozefiak A. , *Chlamydia trachomatis* and herpes simplex virus 2 infection in vulvar intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2006. 27(4): p. 405-8.
13. Madeleine MM, Antilla T, Schwartz SM, *et al.* Risk of cervical cancer associated with *Chlamydia trachomatis* antibodies by histology, HPV type and HPV cofactors. *Int J Cancer* 2007; 120(3): 650-655.
14. Zereu M, Zetler CG, Cambruzzi E, Zelmanowicz A, *Herpes simplex virus type 2* and *Chlamydia trachomatis* in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2007; 105(1):172-5.
15. Dillner J, Lenner P, Lehtinen M, *et al.* A population-based seroepidemiological study of cervical cancer. *Cancer Res* 1994; 54(4): 134-41.
16. Koskela P, Antilla T, Bjorge T, *et al.* *Chlamydia trachomatis* infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 2000; 85(1): 35-39.

17. Antilla T, Sajkko P, Koskella P, *et al.* Sorotypes of Chlamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. *JAMA* 2001; 285: 47-51.
18. Doeberitz VK. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by oncogenic human papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002; 38: 2229-2242.
19. Keating JT, Ince T, Crum CP. Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis. *Adv Anat Pathol* 2001; 8: 83-92.
20. Bulten J, van der Avoort IA, Melchers WJ *et al.* p14<sup>ARF</sup> and p16<sup>INK4A</sup>, two products of the same gene, are differently expressed in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 2006; 101(3): 487-494.
21. Queiroz C, Silva TC, Alves VAF, *et al.* P16<sup>INK4a</sup> expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathology Research and Practice* 2006; 202: 77-83.
22. Benevolo M, Mottolese M, Marandino F, *et al.* Immunohistochemical expression of p16<sup>INK4a</sup> is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. *Mod Pathol* 2006; 19(3): 384-391.
23. Garzetti GG, Ciavattini AT, Lucarini G, *et al.* MIB-1 immunostaining in stage I squamous cervical carcinoma: Relationship with Natural Killer Cell Activity. *Gynecol Oncol* 1995; 58: 28-33.
24. Fernandes MGM, Ferreira FVA, Ferreira SNH, *et al.* MIB-1 and p53 in penile intraepithelial and invasive squamous HPV-related lesions. *Rev Bras Canc* 2002; 48(1): 20-37.
25. Sarian LO, Derchain SF, Yoshida A, Vassallo J, Pignataro F, Andrade LADA. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and Ki67 as related to disease severity and HPV detection in squamous lesions of the cervix. *Gynecologic Oncology* 2006; 102(3): 537-541.

26. Logani S, Lu D, Quint WGV, *et al.* Low-grade vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia: correlation of histologic features with human papillomavirus DNA detection and MIB-1 immunostaining. *Mod Pathol* 2003; 16(8): 735-741.
27. Agoff SN, Lin P, Morihara J *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. *Mod Pathol* 2003; 16(7): 665-673.
28. Koyamatsu Y, Yokoyama M, Nakao Y *et al.* A comparative analysis of human papillomavirus types 16 and 18 and expressing of p53 gene and Ki-67 in cervical, vaginal, and vulvar carcinomas. *Gynecol Oncol* 2003; 90: 547-551.
29. Queiroz C, Silva CT, Alves VA *et al.* Comparative study of the expression of cellular cycle proteins in cervical intraepithelial lesions. *Pathol Res Pract* 2006; 202(10): 731-7.
30. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1999. Appendix E: commonly used techniques in molecular cloning. Purification of nucleic acids. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor, New York, pp. E.3-E.4 (3v).
31. Bauer HM, Hildesheim.A, Schiffman MH *et al.* Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis* 1993; 20(5): p. 274-8.
32. Coutlee F, Gravitt P, Kornegay J, *et al.* Use of PGM1 primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol* 2002; 40(3): 902-7.
33. Becker D. Detecção de *Chlamydia trachomatis* em amostras cervicais por Reação em cadeia da Polimerase (Dissertação de Mestrado). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. 2005. P. 90.

34. Cuzick J, Terry G, Ho L, *et al.* Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 1994; 69(1): 167-71.
35. Richart R.M. A modified terminology for cervical Intraepithelial Neoplasia. *Obstetrics & Gynecology* 1990; 75 (1):131-133.
36. Wright TC Jr, Cox JT, Massad LS, *et al.* 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA* 2002; 287:2120-9.
37. Mills B (1992). Immunohistochemistry. In: *Laboratory Methods Immunotechnology*. Ed American Registry of Pathology (Washington), 247-255.
38. Santos RTM, Wakamatsu A, Kanamura CT, *et al.* 1999. Procedimientos em Imuno-histoquímica e Hibridação “in situ”. In: *Manual de Imuno-histoquímica*. Eds: Alves, V.A.F.; Bacchi, C.E., Vassalo, J. (SP).p.229-259.
39. De Lucca GD, Marin H, Schelover E, *et al.* Infeccion por chlamydia trachomatis y Papilomavirus en mujeres con alteraciones citohistologicas de cuello uterino. *Medicina (Buenos Aires)* 2006; 66: 303-306.
40. Bosh FX, de SanJose S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers* 2007; 23(4): 213-17.
41. Golijow CD; Abba MC, Mourón SA, *et al.* Chlamydia trachomatis and Human Papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. *Gynecol Oncol* 2005; 96: 181-186.
42. Petersen RW, Tabrizi SN, Garland S, Quinlivan JA. Prevalence of Chlamydia trachomatis in a public colposcopy clinic population. *Sex Health* 2007; 4(2): 133-6.

43. Denks K, Spaeth EL, Jérs K, *et al.* Coinfection of *Chlamydia trachomatis*, *Uresplasma urealyticum* and human papillomavirus among patients attending STD clinics in Estonia. *Scand J Infect Dis* 2007; 39(8):714-8.
44. Finnan RR, Musharrafieh U, Almawi WY. Detection of *Chlamydia trachomatis* and herpes simplex virus type 1 or 2 in cervical samples in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV negative women. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(9): 927-30.
45. Franceschi S, Smith JS, van den brule A, *et al.* Cervical infection with *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in women from ten areas in four continents. A cross-sectional study. *Sex Transm Dis* 2007; 34(8): 563-9.
46. Naucler P, Chen NC, Persson K, *et al.* Seroprevalence of Human Papillomaviruses and *Chlamydia trachomatis* and cervical cancer risk: nested case-control study. *J Gen Virol* 2007; 88(3): 814-22.
47. Murphy N, Ring M, Killalea AG, *et al.* P16<sup>INK4A</sup> as a marker for cervical dyskariosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and Thin Prep TM smears. *J Clin Pathol*, 2003; 56:56-63.
48. Walts AE, Lechago J, Bose S. P16 and Ki67 immunostaining is a useful adjunct in the assessment of biopsies for HPV-associated anal intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2006; 30(7): 795-801.
49. Sahebali S, Depuydt CE, Boulet GA, *et al.* Immunocytochemistry in liquid-based cervical cytology: analysis of clinical use following a cross-sectional study. *Int J Cancer* 2006;118(5): 1254-60.
50. Fehér E, Szalmás A. *Prevalence of Chlamydia trachomatis and oncogenic human papillomavirus types in cytologic atypia of the uterine cervix.* *Acta Microbiol Immunol Hung* 2006; 53(4): 479-87.

**Article 2: *Chlamydia trachomatis* (CT) AND HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) CO-INFECTION: ASSOCIATION WITH P16<sup>INK4A</sup> AND KI67 EXPRESSION IN BIOPSIES OF PATIENTS WITH PRE-NEOPLASTIC AND NEOPLASTIC LESIONS**

**Mylius LC<sup>1,2</sup>; Igansi CN<sup>3</sup>; Meurer L<sup>4</sup>; Edelweiss MIA<sup>1,4</sup>; Bozzetti MC<sup>1,3</sup>**

1. Post-graduation program in Medical Sciences, 2. Pharmacy College, 3. Post-graduation program in Epidemiology, 4. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Supporting Source: Fipe, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS - Brazil**

**Sex Trans Dis**

ABSTRACT:

**Objectives:** Identify the frequency of co-infection by Human Papillomavirus (HPV) and *Chlamydia trachomatis* (CT) in cervical lesions and relate this frequency with the immunohistochemical expression of p16<sup>INK4a</sup> and Ki67, both oncogenicity markers.

**Methods:** Cross-sectional study with 86 women attended in a primary care unit of the city of Porto Alegre-RS, Brazil. A cervical swab was collected for HPV-DNA and DNA-CT research, through the Polymerase Chain Reaction technique (PCR), as well as for the research of HPV oncogenic subtypes. The immunohistochemical analysis was performed with the biopsy cervical tissue to identify the expression of the p16<sup>INK4a</sup> and Ki67 cell cycle markers.

**Results:** The women with positive diagnosis of HPV-DNA had, in average, 37.4 ± 1.8 years old and those that presented coinfection, 37.3 ± 3.6 years old. About 83.0% and 19.0% had positive

diagnosis of HPV-DNA and DNA-CT, respectively. All the women with positive diagnosis of DNA-CT had also positive diagnosis of HPV-DNA. Among the coinfection carriers, 56.0% expressed p16<sup>INK4a</sup> (R=0.51, IC95%: 0,17-1,57). There was a statistically significant association between the histological grade of the lesion and the Ki67 expression. All high-grade lesions, 50.0% of low-grade lesions and 31.0% of negative biopsies expressed Ki67 (p=0,004). A total of 37.0% of co-infection's womens expressed both markers.

**Conclusion:** Although more than a half of the coinfection carriers have expressed p16<sup>INK4a</sup> and more than one third have expressed both the markers studied, the results suggest the absence of association between those variables. However, other studies involving larger samples are necessary to corroborate such findings.

## ***Introduction:***

The invasive cervical cancer is preceded by a spectrum of progressive abnormalities in the epithelium, like the cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in the different histological grades.<sup>1</sup>

The persistent genital infection by the Human Papillomavirus (HPV) is decisive in the cervical cancer etiology, being most common among young sexually active women.<sup>2</sup> The estimation of sexually active individuals that get into contact with this virus range between 5% and 80%, which are susceptible to develop an infection along the life course.<sup>3</sup>

Other factors such as age, marital status, age of the first sexual relation, number of sexual partners, smoking, use of hormones and coinfections may influence the infection prognosis.<sup>4-6</sup> Another aspect to be considered are the social inequalities that contribute to limit the access to effective prevention measures as the periodic tracking and vaccination.<sup>7,8</sup>

A study carried out in 2006 compared women attended at private and public health cares in Rio de Janeiro, Brazil and found that negative diagnoses and benign lesions were more frequent in the private health service and malignant lesions in patients attended by the public service. In this latter group, the biggest prevalence was of cytologically normal women, but infected with HPV, suggesting a bigger exposure.<sup>8</sup>

The bacterial coinfection by *Chlamydia trachomatis* (CT) in women with history of HPV infection has been studied as a potential factor that contributes to the development of neoplasias and cervical cancer. However, some authors have suggested that the previous infection by CT is associated with a high risk to develop the disease, but other authors have not observed this association.<sup>9-12</sup> However, some studies suggest that this association is negative only in cases of adenocarcinoma.<sup>13-14</sup> Other authors also suggest the presence of the association between the presence of CT and the cervical carcinoma.<sup>15-17</sup>

In a study carried out in 2002, authors followed up for 26 years a group of 118 women that developed cancer after being submitted to a preventive examination, in average, 5 to 6 years before, and compared them with a group that remained with the normal examination. The authors verified, through the Polymerase Chain Reaction technique (PCR), the presence of HPV-DNA and DNA-CT, where the presence of CT was reported in 8% of the patients with cancer. This result showed a relative risk of 17.1 (IC95% 2.6-infinite) of the patients with coinfection by HPV and CT. 9

P16<sup>INK4a</sup> is a cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) that reduces the cell cycle's speed by controlling the expression of the E2F transcription factor. The high-grade infection by HPV is involved in the carcinogenesis and, the HPV integration in the human genome results in the superexpression of E6 and E7 viral oncoproteins.<sup>18</sup> The E6 protein links to the p53 tumor suppressor gene and causes the degradation and the subsequent genetic integrity loss.<sup>19</sup> E7 HPV interacts with the retinoblastoma protein (pRb) and neutralizes the function of this group's proteins, resulting in the release of the E2F transcription factor of the pRb-E2F complex. The E2F accumulation also induces the p16<sup>INK4A</sup> activity.<sup>20-21</sup>

In a study carried out by Benevollo *et al.*(2006), the results found showed that none of the negative cervical tissues evaluated through immunohistochemistry presented a positive diagnosis for p16<sup>INK4a</sup>, while there was a constant and significant increase in this marker's positivity, according to the histological grade, where 31.0% occurred in CIN 1 lesions, 90% in CIN 2 and 100% in CIN 3 and carcinomas (P<0.0001). Thus, the p16<sup>INK4a</sup> superexpression consistently seems to point a high sensitivity (84.0%) and specificity (98.0%) to detect the high-risk HPV with a high positive predictive value (97.0%) and negative predictive value (86.0%).<sup>22</sup>

The Ki67 monoclonal antibody reacts with a non-histone nuclear protein that is expressed in a nucleus of proliferating cells through the cell cycle, except in G0 and in the precocious G1 phase. 23,24 Several immunohistochemical studies with this antibody have shown an association between this marker, the histological grade and the tumor development, suggesting that the Ki67 expression is a useful examination to inform the prognosis in connective tissue diseases, in lymphoproliferative disorders and in some carcinomas. 23

Cells on the normal epithelium superficial layer usually remain at rest and do not express Ki67, while cells on the basal layer usually do, due to this layer's functional proliferative character. 25 Some authors have shown a relation between Ki67 and the lesion severity or the growth rate, and its utility in the study of vulvar and vaginal lesion caused by HPV. 25-28 Therefore, the determination of Ki67 seems to be a relevant additional and complementary examination in the detection and distinction of different lesion grades in the uterine cervix.

It's known that the high-risk HPV, through oncoproteins, can deplete the action of suppressor genes like the p53 and pRb, causing the superexpression of the CDK inhibitors. 29 However, in coinfecting patients, this effect has not been studied yet.

Knowing possible additional factors that may influence the HPV infection development and identifying possible markers for such associations justify the need to study such associations so that prevention, diagnosis and treatment measures can be planned. Thus, this study had the purpose to verify the p16<sup>INK4A</sup> and Ki67 immunohistochemical expression in women with positive diagnosis of HPV-DNA and/or DNA\_CT in women attended in a primary care unit in Porto Alegre, in the South of Brazil.

### ***Subjects***

It is a cross-sectional study that involved 86 women come from a primary care service, selected from participants in a group study started in February 2003. This sample included women that were submitted to examinations for HPV-DNA/DNA-CT and to uterine cervix biopsy for histopathological analysis.

### ***Methods***

#### ***HPV-DNA and Chlamydia-DNA Research.***

The HPV-DNA and DNA-CT research was carried out from uterine cervix samples collected from all the women studied, through the PCR.

#### ***HPV-DNA Extraction***

The extraction of DNA from the cervical-vaginal swab samples was carried out according to the Proteinase K protocol.<sup>30</sup>

The technique was directed to the L1 gene and the primers used were My09 and My11. The PCR conditions were described by Bauer *et al* (1993) and Coutlée *et al* (2002). For the PCR reaction internal control,  $\beta$ -globin primers were developed and tested in all the samples.<sup>31,32</sup>

For DNA-CT, the technique was standardized by Becker, 2005<sup>33</sup> using the CTP1 and CTP2 primers that flank a 201pb segment of the ORF number 4 of the critical Chlamydia trachomatis plasmid. This segment is situated 2940pb from the single BamHI restriction site:

CTP1 5'... TAGTAACTGCCACTTCATCA... 3'

CTP2 5'... TTCCCCTTGTAATTCGTTGC... 3'

In order to control the reactions functioning, along with each DNA PCR of clinical samples, a reaction positive control was tested, which consisted in a 450pb fragment

corresponding to the Caski and SiHa cells (cells infected with the HPV virus), a 201pb fragment corresponds to cells infected by CT; and a reaction negative control with the omission of any DNA. In all the tested samples, primers complementing the human  $\alpha$ -globin gene were used as a reaction internal control, and the gH20 and PC04 primers of the human B-globin constitutive gene were used as controls.

### ***Research of the most frequent oncogenic types***

All the positive samples in the HPV-DNA screening were typed for AR (HPV-16, -18 and -31), using specific primers corresponding to the regions E6 and E7 of the viral genome. The amplification conditions and the primers used are based on the methodology described by Cuzick *et al* (1994)<sup>34</sup> (Table 1):

Table 1: PCR *Primers* and amplification conditions

<b>Viral Type</b>	<b>Sequence</b>	<b>Ta<sup>a</sup> (°C)</b>
<b>HPV-16</b>	5'...GC GAT CCT GTC TGC TTT TAT ACT AA...3' (sense)	54°C
	5'...AAG GCC AAC TAA ATG TCA C...3' (antisense)	
<b>HPV-18</b>	5'...TGC AGC ACG AAT GGC ACTGGC CTG...3' (sense)	70°C
	5'...CAC GGC GAC CCT ACA AGC TAC CTG...3' (antisense)	
<b>HPV-31</b>	31A 5'...TACCTGTGTTTCTGTTAAC...3' (sense)	52°C .
	31S 5'...AGAAAGACCTCGGAAATTG...3' (antissense)	

<sup>a</sup>Annealing temperature

### ***Biopsies***

Plates have been prepared from the biopsy paraffin blocks. These have been dyed through the hematoxylin-eosin technique for the histological classification, according to Richardt criteria, modified in this work to LSIL, HSIL.<sup>35,36</sup> The LSIL category included the results with grade-1 cervical intraepithelial neoplasia diagnosis (CIN1) and the HSIL category included the findings

with CIN 2 and 3 diagnosis<sup>37</sup>. The diagnosis of absence of neoplastic alterations was found when no alteration was observed, and this included the squamous metaplasia and /or chronic inflammation diagnoses. Later, the cases were revised by the trained pathologists (MIE and LM) from the Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA [Center for Experimental Research of Hospital of Clinics of Porto Alegre – HCPA], RS-Brazil.

### ***Immunohistochemistry***

The samples were fixed in formalin and, embedded in paraffin, were cut out at 4 micrometers, deparaffinized in xylene and after rehydrated. The antigen retrieval was made in citrate buffer pH 6.0 and, later taken to microwave for 20 minutes. The sections were placed at room temperature and washed with phosphate buffer three times. The plates were placed in After the endogenous peroxidase blockage, the plates were re-hydrated and was submitted to immunohistochemistry process.<sup>38,39</sup>

The antibodies used were p16<sup>INK4a</sup>, Neomarkers, CA, USA, clone 16P07 at the dilution of 1:75 and anti-Ki67, DAKO, Glostrup, Denmark, clone MIB-1, at the dilution of 1:30.

The expression pattern for p16<sup>INK4a</sup> in the squamous intraepithelial lesion (SIL) was graduated as follows Bulten J. et al., 2006<sup>20</sup>: negative (-) if none of the cells expressed coloring, positive (+, weak) if the percentage of cells that expressed ranged between 1-25.0%, (++, moderate) if the percentage ranged between 26-75.0% e (+++, strong) if over 75.0% of the cells were stained, both in cytoplasm and the nucleus. The cells' expression pattern was divided into focal if the expression was concentrated in some areas and diffuse if the expression was distributed throughout the plate.

The Ki67 was considered as positive if the cells nucleus was brown-stained. In all the samples, 100 to 200 cells were counted and, the results were expressed in percentage.

### ***Study's Variables***

The study conclusions were the genital infection by HPV and/or *Chlamydia trachomatis* and the histopathological diagnosis of the uterine cervix lesions. The p16<sup>INK4a</sup> and Ki67 expression was related with such conclusions. The independent variables studied include demographic, sexual behavior, reproductive data and relapsing morbidities.

### ***Data Quality Control:***

The information was stored in a double-type database, where 20% of the questionnaires were selected at random and contrasted with the original ones. Possible errors and divergences observed were corrected.

### ***Statistical Analysis***

In order to compare the categorical variables, the Chi-square test or Fisher's exact test was used, when recommended. The continuous variables were analyzed through the Student's T test and ANOVA. The findings with p value  $\leq 0.05$  were considered as statistically significant. For the analysis of data, the SPSS program version 13.0 was used.

### **Results**

#### **PCR for HPV and CT:**

86 patients were analyzed, among which 83.0% (71/86) presented positive diagnosis of HPV-DNA and 19.0% (16/86) of DNA-CT. All women with positive diagnosis of DNA-CT were also positive for HPV-DNA (p=0.06). About 40.0% (34/86) were positive for HR-HPV, among which 37.0% (6/34) were positive for CT-DNA. The most frequent HPV-AR was HPV-16 (50.0%), followed by HPV-31 (38.0%) and HPV 18 (12%).

The average age of the patients with positive diagnosis of HPV-DNA was of  $37.4 \pm 1.8$  years old and of those that presented coinfection,  $37.3 \pm 3.6$  years old.

The Table 2 describes the characteristics of women that presented coinfection (HPV-DNA and DNA-CT). It was noted a statistically significant association of this coinfection with the education level ( $p= 0.04$ ).

**Table 2. Characteristics of women with coinfection by HPV and CT in a group of 86 patients.**

Variables	Coinfection		p Value
	Yes N (%)	No N (%)	
<b>Age</b>			
<35 years old	07 (44,0)	29 (41,0)	0,86
>35 years old	09 (56,0)	41 (59,0)	
<b>Marital Status</b>			
Single	05 (31,0)	38 (54,0)	0,16
Married	11 (69,0)	32 (46,0)	
<b>Skin color</b>			
White	12 (75,0)	59 (84,0)	0,46
Non-white	04 (25,0)	11 (16,0)	
<b>Education</b>			
Up to Incomplete Elementary school 1 <sup>o</sup> ao	02 (12)	22 (32)	<b>0,04</b>
Complete Elementary School to Incomplete High School	09 (56)	17 (24)	
Complete High School or higher	05 (32)	31 (44)	
<b>Menarche</b>			
< 12 years old	05 (31)	19 (27)	0,76
> 12 years old	11 (69)	51 (73)	
<b>First Intercourse</b>			
≤ 17 years	09 (56)	28 (40)	0,34
17 a 19 years	02 (13)	22 (31)	
20 years or olders	05 (31)	20 (29)	
<b>No. of Partners/ life</b>			
> 2 partners	06 (37)	33 (47)	0,67
Up to 2 partners	10 (63)	37 (53)	
<b>No. of pregnancies</b>			
More than 3 children	03 (19)	33 (47)	0,07
≤ 3 children	13 (81)	37 (53)	
<b>Age at the 1<sup>st</sup> Pregnancy</b>			
≤ 17 years old	05 (31)	14 (20)	0,33
≥ 18 years old	11 (69)	56 (80)	
<b>Oral Contraceptives (OC) use</b>			
Yes	14 (87)	50 (71)	0,22
No	02 (13)	20 (29)	
<b>Sexual Transmitted Disease (STD)</b>			
Yes	14 (87)	44 (63)	0,11
No	02 (13)	26 (37)	
<b>Smoking</b>			
Yes	02 (13,0)	19 (27,0)	0,34
No	14 (87,0)	51 (73,0)	

No statistically significant association was observed between the anatomopathological examination and the presence of coinfection ( $p=0.75$ ) (Table 2).

**Table 3. Anatomopathological characteristics of 86 patients with coinfection**

Anatomopathological	Co-infection		<i>p</i> *
	Yes	No	
HSIL	01 (16,7%)	05 (83,3%)	<i>p</i> =0,75
LSIL	11 (22,0%)	39 (78,0%)	
Normal	04 (13,3%)	26 (86,7%)	

\* *p* value for the Pearson  $\chi^2$  test

In the immunohistochemical analysis, it was verified that among the 86 patients evaluated, 56.0% of the coinfection carriers expressed the p16<sup>INK4a</sup> ( $p=0.38$ ; OR=0.51, CI95%: 0.17-1.57). In the presence of coinfection, the p16<sup>INK4a</sup> expression was from moderate to strong in approximately 37.0% and the expression standard was diffuse in 50.0%. In the positive biopsies for HPV-DNA, 78.0% expressed this protein, where the expression was from moderate to strong in 54.0% of the cases and the standard was diffuse in 56.0%. Regarding the anatomopathological analysis, 83.0% of the high-grade lesions expressed the p16<sup>INK4a</sup>. Among the low-grade lesions and the negative biopsies, 72.0% and 60.0% expressed this protein, respectively ( $p= 0.43$ ).

About 50.0% (8/16) of the women with coinfection expressed the Ki67 antibody. In women infected by HPV, this expression was of 38.0% ( $p=0.73$ ).

There was a statistically significant association between the lesion's histological grade and the Ki67 expression. In 100.0% of the high-grade lesions, 50.0% of the low-grade lesions and 31.0% of the negative biopsies expressed Ki67 ( $p=0.004$ ).

Regarding the two markers studied and the coinfection, it was verified that approximately 37.0% ( $p=0.31$ ) of the women with co-infection and 29.0% ( $p=0.16$ ) of the women without coinfection expressed both markers.

The sensitivity, specificity and the positive and negative predictive values (PPV NPV) were estimated for the p16<sup>INK4a</sup> and Ki67 markers in relation to the anatomopathological examination. For the p16<sup>INK4a</sup>, the sensitivity was of 25.0% (IC95%:0.7- 49.30.0%), the specificity was of 72.9% (IC95%: 61.7- 84.0%), PPV of 17.4% (IC95%: 0 – 35.0%) and NPV was of 81.0% (IC95%: 70.5-91.40%). However, in relation to the Ki67, it was verified a sensitivity of 50.0% (IC95%:23-78.0%), specificity of 66.0% (IC95%:54-79.0%), PPV de 25.0% (IC95%:8.4-42.0%) and NPV 85.0% (IC95%:75-96.0%). The table 3 describes the distribution of the number of cells (%) that expressed both markers, p16<sup>INK4a</sup> and Ki67.

Table 4: Number of cells that expressed both markers\*

		p16 <sup>INK4a</sup>			
		No expression	≥ 1 ≤ 10	≥ 11 ≤ 50 cels	≥51 cels
<b>Ki67</b>	Positive	06 (18.7)	0 (0.0%)	04 (12.5%)	22 (68.8%)
	Negative	20 (37.0%)	04 (7.4%)	12 (21.25%)	18 (33.4%)

\*  $p$  value = 0.01 for the association (Fisher's Exact Test)

### ***Discussion***

Studies have shown that the HPV is a necessary factor for the development of precursor lesions and cervical cancer; however, cofactors such as the use of oral contraceptives, other hormones, parity, smoking and previous exposure to other sexual agents, such as *Chlamydia trachomatis* (CT) and herpes simplex virus 2, have been mentioned.<sup>14,39,40</sup>

CT is a necessarily intracellular agent that infects the genital tract's epithelial cells and the ocular tissue. It is one of the most common pathologies worldwide with 89 million new cases/year. Although it is quite often an asymptomatic infection, it is considered as a cause of morbidity in sexually active women, causing severe sequelae like pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancy and tubal infertility. It is also associated with hypertrophy and induction of metaplasia, suggesting that it may have any role in the cervical cancer etiology.<sup>39,41</sup> In addition to that, there are evidences that women contaminated with HPV present a higher risk to contract another infection, like that caused by CT.<sup>9,42</sup> In this study, the frequency of HPV infection was of 83.0% and CT infection, 19.0%. This percentage increased, if compared to other studies' result, possibly for the fact that it is a sample with a bigger probability to observe positive women, provided that all the women studied were submitted to biopsy after alterations have been found in the colposcopic examination.<sup>42,43</sup> In relation to the study developed by Denks *et al.* (2007), was verified a prevalence of 8% of CT and a significant association of this infection with high-risk HPV (OR=2.5,  $p < 0.005$ ), especially in women aged 41 years old or older. However, the study carried out by Petersen *et al.* (2007), among the 581 women registered in a colposcopy clinic, 560 women was evaluated (98%) for colposcopy and biopsy. It was observed a ratio of infection probabilities for *C. trachomatis* of 2.1% (CI 95%:1.5-2.7). In this same study, stratifying for the age, in patients aged 25 years old or younger, this value rises to 5.8% (CI95%: 3.8-7.8) and, in older women, this is only 0.9% (CI 95%: 0.4-1.4%).

Education, in our study, showed to be significantly associated with coinfection. This fact can suggest that education may interfere in the level of knowledge about risk factors, exposure and information on means of prevention. De Lucca et al, (2006) comment an association between the presence of CT infection and the low social-economic level (32.9% of the patients) in relation to those from the medium or high social-economic classes (15.7% of the patients). A higher risk of infection was also observed in the patients infected with the HPV virus, with a statistically significant difference ( $p=0.016$ ).<sup>39</sup> In relation to the viral types tested, our results point the HPV-16 as the most frequent high-risk viral type, confirming the findings of other studies.<sup>12, 39,44</sup>

A study developed in 5328 women aged between 15-44 years old in 8 countries presented a prevalence of 0.2% of CT infection (CI95%: 0.0-0.7%) in Spain and 5.6% (CI95% 3.4-7.8%) in Nigeria, being higher within the age range between 15-24 years old (4.5, CI95%: 3.4-8.0%) than within the age range between 25-44 years old (2.6, CI95%: 2.1-3.1). Researchers believe that such prevalence data are low and do not express the findings in high-risk women.<sup>45</sup>

It is known that the HPV infection causes cytological alterations compatible with low-grade lesion or more severe alterations. De Paula et al. (2007) 11 investigated in Minas Gerais, Brazil, the presence of DNA-CT and HPV-DNA in 250 cervical-vaginal samples of normal patients or patients with cytological alterations. Among them, 70.0% were negative, 40.0% (100/250) were HPV-DNA carriers and 5.2%(13/250) presented a positive diagnosis of CT. Among the positive samples for cytology, the HPV-DNA was detected in 73.3% of the cases and the DNA-CT, in 9.33%. The higher coinfection rate, 15.4%, was found in the samples carrying ASC-US/AG-US. An association between the HPV infection and the cytological alterations was verified; however, for cases of CT infection or coinfection, such association was not observed. Considering this fact and relating it to the results found in this study, it can be inferred that the

association was not verified due to the low number of CT cases found. However, it can be noted that only 4/16 (25%) of the cases present coinfection and normal anatomopathological result.

A case-control study performed with a group of 13.595 women started in 1991, with a 9-year follow up, detected the presence of HPV- 6, -16, -18 and CT serum antibodies. The study included 114 cases, where 72 were incidental and 42 were prevalent at the study entrance. The HPV-16 seropositivity was associated with cervical cancer (OR=6.33, CI95%: 3.45-11.62). In general, the CT infection did not show to be associated with the cervical cancer; however, when the incidental case is evaluated, this association appears (OR=2.94, CI95%: 1.16-8.47).<sup>46</sup> The research carried out by de Paula et al. (2007) 11 did not find any association between cervical lesions and the CT infection or the CT and HPV coinfection.

Yet Madeleine *et al.* (2007) <sup>13</sup> found a significant association between the risk of cervical carcinoma and the presence of CT antibodies, regardless of the HPV type. In relation to the serotypes tested, 6/10 presented an association: serotype B (OR=3.6; CI95%:1.5-8.4), serotype D (OR=2.1; CI95%: 1.2-3.5), serotype E (OR=2.4; CI95%:1.4-3.9), serotype G (OR=3.0; CI95%:1.1-7.9), serotype I (OR= 4.2; CI95%: 1.5-11.7), and serotype J (OR=2.3; CI95%: 1.0-5.1). The serotypes C, F, H and K were not associated and presented a low prevalence in the population.

In a study that evaluated the presence of HPV-DNA and the presence of coinfection with Herpes virus type 2 (HSV-2) and CT in vulvar intraepithelial neoplasia (VIN) and in normal tissue, the HPV-DNA was present in 75.6% of the cases, where 73% of them were HPV-16. In the control group, HPV was detected in only 1 case (2.43%). In the group studied, among the 41 cases of VIN, HSV-2 was found in 6/41cases (14.63%) and, therefore, not different from the control group. The bacterial infection by CT was also found in 6/41 cases (14.63%) in the group

studied and, in 9.75% (4/41 cases) in the control group. The relation between infection by HPV and HSV-2, as well as, HPV and CT, did not present any correlation in this study.<sup>12</sup> However, Finnan RR *et al.* (2006)<sup>44</sup> detected a high prevalence of CT, HSV-1 and HSV-2 in HPV positive samples. High-risk HPV and the coinfection of HPV-CT and HPV-HSV-1, but not HSV-2, were associated with a higher risk of cervical cancer.

The cyclin-dependent kinase inhibitor (p16<sup>INK4a</sup>) expression has been mentioned in researches as a promising marker for HPV-induced lesions. However, studies did not evaluate if this marker's expression is increased in cases of coinfection by CT. The p16<sup>INK4a</sup> expression can be evaluated in relation to the percentage of expressing cells, through the expression standard and the expression intensity. In HPV-carrying patients, it was verified that 78.2% expressed the protein, where the intensity was moderate to strong in 54.5% of the cases and the standard was diffuse in 56.4% as expected. The p16<sup>INK4a</sup> appeared as superexpressed by the interaction of the high-risk HPV E7 oncoprotein and the pRb, resulting in the release of the E2F transcription factor. This interaction is analogous to the CDK-mediated phosphorylation, resulting in the p16<sup>INK4a</sup> inhibitor accumulation.<sup>47</sup> However, in patients with coinfection, in our study, the p16<sup>INK4a</sup> expression was 56.3% and it did not present any significant association ( $p=0.23$ ). The expression appeared to be from moderate to strong in 37.5% of the cases, where the standard was diffuse in 50%, not statistically different from those caused by the presence of HPV-DNA.

Ki67 is a proliferation antigen that has been related to carcinogenesis in different tumor types.<sup>24,48</sup> High-risk HPV infections and cell cycle alterations with a higher Ki67 expression have been mentioned.<sup>25,26,28,49</sup> The CT infection has been suggested as a risk factor for HPV and, consequently for carcinogenesis.<sup>9,39,46</sup> This study's proposal was to verify if coinfection increases the proliferation, through the Ki67 determination in relation to the infection caused by

HPV, provided that studies verifying this association were not found in literature. In this study, Ki67 was expressed in 50.0% of the coinfection cases and in 34.0% of the positive cases of HPV-DNA.

Through this immunohistochemical analysis, we intended to investigate if some of these markers or the combination of both could suggest a bigger association in the patients with coinfection; however, this finding was not observed. It was found that there was no significant difference in the p16<sup>INK4a</sup> and Ki67 expression in the patients with coinfection, in relation to the positivity for HPV-DNA. Just like the results observed by Fehér & Szalmáz (2006)<sup>50</sup> and Zereu *et al.* (2007)<sup>14</sup>, our findings suggest the presence of CT does not seem to be a factor associated with cervical carcinogenesis, if we consider the data obtained in this immunohistochemical analysis.

Thus, although more than a half of the coinfection carriers have expressed p16INK4a and more than one third have expressed both the markers studied, the results suggest the absence of association between those variables. However, other studies involving larger samples are necessary to corroborate such findings in a more conclusive manner.

## **References**

1. Park JS, Rhyn JW, Kim CJ, et al. Neoplastic change of squamo-columnar junction in uterine cervix and vaginal epithelium by exogenous estrogen in HPV-18 URR E6/E7 transgenic mice. *Gynecol Oncol* 2003; 89: 360-368.
2. Sijvarger CC, González JV, Prieto A, et al. Cervical infection epidemiology of human papillomavirus in Ushuaia, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2006; **38**(1): 19-24.
3. Weaver BA. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. *J Am Osteopath Assoc.*, 2006. **106**(3(Suppl1)): p. S2-8. Review.
4. Ferrera A, Velema J, Figueroa M, et al. Co-factors related to the causal relationship between human papillomavirus and invasive cervical cancer. *Int Journal of Epidemiol* 2000; **29**: 817-825.
5. Wright JD, Li J, Gerhard DS, et al. Human papillomavirus type and tobacco use as predictors of survival in early stage cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2005; **98**(1): 84-91.
6. Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, et al. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* 2006; **24S3**: p. S3/52-S3/61.
7. Goldie S. A public health approach to cervical cancer control: Considerations of screening and vaccination strategies. *Int J Gynecol Obstetr* 2006; **94**(suppl 1): S95-S105.
8. Oliveira LHS, Rosa MLG, Pereira CRN, et al. Human Papillomavirus status and cervical abnormalities in women from public and private health care in Rio de Janeiro state, Brazil. *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 2006; **48**(5): 279-285.
9. Wallin KL, Wiklund F, Luostarinen T, et al. A population-based prospective study of Chlamydia trachomatis infection and cervical cancer carcinoma. *Int J Cancer*, 2002; 101(4): 371-374.

10. Smith JS, Bosetti C, Munoz N, *et al.* *Chlamydia trachomatis* and invasive cervical cancer: A pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int J Cancer* 2004; 111(3): 431-439.
11. De Paula FD, Fernandes AP, Carmo BB, *et al.* Molecular detection of *Chlamydia trachomatis* and HPV infections in cervical samples with normal and abnormal cytopathological findings. *Diagn Cytopathol* 2007; 35(4): 198-202.
12. Kwasniewska A, K.E., Visconti J, Zdunek M, Szymaniski M, Gozdzicka-Jozefiak A. , *Chlamydia trachomatis* and herpes simplex virus 2 infection in vulvar intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2006. 27(4): p. 405-8.
13. Madeleine MM, Antilla T, Schwartz SM, *et al.* Risk of cervical cancer associated with *Chlamydia trachomatis* antibodies by histology, HPV type and HPV cofactors. *Int J Cancer* 2007; 120(3): 650-655.
14. Zereu M, Zetler CG, Cambuzzi E, Zelmanowicz A, *Herpes simplex virus type 2* and *Chlamydia trachomatis* in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2007; 105(1):172-5.
15. Dillner J, Lenner P, Lehtinen M, *et al.* A population-based seroepidemiological study of cervical cancer. *Cancer Res* 1994; 54(4): 134-41.
16. Koskela P, Antilla T, Bjorge T, *et al.* *Chlamydia trachomatis* infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 2000; 85(1): 35-39.
17. Antilla T, Sajkko P, Koskella P, *et al.* Sorotypes of *Chlamydia trachomatis* and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. *JAMA* 2001; 285: 47-51.

18. Doeberitz VK. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by oncogenic human papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002; 38: 2229-2242.
19. Keating JT, Ince T, Crum CP. Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis. *Adv Anat Pathol* 2001; 8: 83-92.
20. Bulten J, van der Avoort IA, Melchers WJ *et al.* p14<sup>ARF</sup> and p16<sup>INK4A</sup>, two products of the same gene, are differently expressed in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 2006; 101(3): 487-494.
21. Queiroz C, Silva TC, Alves VAF, *et al.* P16<sup>INK4a</sup> expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathology Research and Practice* 2006; 202: 77-83.
22. Benevolo M, Mottolese M, Marandino F, *et al.* Immunohistochemical expression of p16<sup>INK4a</sup> is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. *Mod Pathol* 2006; 19(3): 384-391.
23. Garzetti GG, Ciavattini AT, Lucarini G, *et al.* MIB-1 immunostaining in stage I squamous cervical carcinoma: Relationship with Natural Killer Cell Activity. *Gynecol Oncol* 1995; 58: 28-33.
24. Fernandes MGM, Ferreira FVA, Ferreira SNH, *et al.* MIB-1 and p53 in penile intraepithelial and invasive squamous HPV-related lesions. *Rev Bras Canc* 2002; 48(1): 20-37.
25. Sarian LO, Derchain SF, Yoshida A, Vassallo J, Pignataro F, Andrade LADA. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and Ki67 as related to disease severity and HPV detection in squamous lesions of the cervix. *Gynecologic Oncology* 2006; 102(3): 537-541.

26. Logani S, Lu D, Quint WGV, *et al.* Low-grade vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia: correlation of histologic features with human papillomavirus DNA detection and MIB-1 immunostaining. *Mod Pathol* 2003; 16(8): 735-741.
27. Agoff SN, Lin P, Morihara J *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. *Mod Pathol* 2003; 16(7): 665-673.
28. Koyamatsu Y, Yokoyama M, Nakao Y *et al.* A comparative analysis of human papillomavirus types 16 and 18 and expressing of p53 gene and Ki-67 in cervical, vaginal, and vulvar carcinomas. *Gynecol Oncol* 2003; 90: 547-551.
29. Queiroz C, Silva CT, Alves VA *et al.* Comparative study of the expression of cellular cycle proteins in cervical intraepithelial lesions. *Pathol Res Pract* 2006; 202(10): 731-7.
30. Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
31. Bauer HM, Hildesheim.A, Schiffman MH *et al.* Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis* 1993; 20(5): p. 274-8.
32. Coutlee F, Gravitt P, Kornegay J, *et al.* Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol* 2002; 40(3): 902-7.
33. Becker D. Detecção de *Chlamydia trachomatis* em amostras cervicais por Reação em cadeia da Polimerase (Dissertação de Mestrado). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.2005. P. 90.

34. Cuzick J, Terry G, Ho L, *et al.* Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 1994; 69(1): 167-71.
35. Richart R.M. A modified terminology for cervical Intraepithelial Neoplasia. *Obstetrics & Gynecology* 1990; 75 (1):131-133.
36. Wright TC Jr, Cox JT, Massad LS, *et al.* 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA* 2002; 287:2120-9.
37. Mills B (1992). Immunohistochemistry. In: *Laboratory Methods Immunotechnology*. Ed American Registry of Pathology (Washington), 247-255.
38. Santos RTM, Wakamatsu A, Kanamura CT, *et al.* 1999. Procedimientos em Imuno-histoquímica e Hibridação “in situ”. In: *Manual de Imuno-histoquímica*. Eds: Alves, V.A.F.; Bacchi, C.E., Vassalo, J. (SP).p.229-259.
39. De Lucca GD, Marin H, Schelover E, *et al.* Infeccion por chlamydia trachomatis y Papilomavirus en mujeres con alteraciones citohistologicas de cuello uterino. *Medicina (Buenos Aires)* 2006; 66: 303-306.
40. Bosh FX, de SanJose S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers* 2007; 23(4): 213-17.
41. Golijow CD; Abba MC, Mourón SA, *et al.* Chlamydia trachomatis and Human Papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. *Gynecol Oncol* 2005; 96: 181-186.
42. Petersen RW, Tabrizi SN, Garland S, Quinlivan JA. Prevalence of Chlamydia trachomatis in a public colposcopy clinic population. *Sex Health* 2007; 4(2): 133-6.

43. Denks K, Spaeth EL, Jérs K, *et al.* Coinfection of *Chlamydia trachomatis*, *Uresplasma urealyticum* and human papillomavirus among patients attending STD clinics in Estonia. *Scand J Infect Dis* 2007; 39(8):714-8.
44. Finnan RR, Musharrafieh U, Almawi WY. Detection of *Chlamydia trachomatis* and herpes simplex virus type 1 or 2 in cervical samples in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV negative women. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(9): 927-30.
45. Franceschi S, Smith JS, van den brule A, *et al.* Cervical infection with *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in women from ten areas in four continents. A cross-sectional study. *Sex Transm Dis* 2007; 34(8): 563-9.
46. Naucler P, Chen NC, Persson K, *et al.* Seroprevalence of Human Papillomaviruses and *Chlamydia trachomatis* and cervical cancer risk: nested case-control study. *J Gen Virol* 2007; 88(3): 814-22.
47. Murphy N, Ring M, Killalea AG, *et al.* P16<sup>INK4A</sup> as a marker for cervical dyskariosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and Thin Prep TM smears. *J Clin Pathol*, 2003; 56:56-63.
48. Walts AE, Lechago J, Bose S. P16 and Ki67 immunostaining is a useful adjunct in the assessment of biopsies for HPV-associated anal intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2006; 30(7): 795-801.
49. Sahebali S, Depuydt CE, Boulet GA, *et al.* Immunocytochemistry in liquid-based cervical cytology: analysis of clinical use following a cross-sectional study. *Int J Cancer* 2006;118(5): 1254-60.
50. Fehér E, Szalmás A. *Prevalence of Chlamydia trachomatis and oncogenic human papillomavirus types in cytologic atypia of the uterine cervix.* *Acta Microbiol Immunol Hung* 2006; 53(4): 479-87.

**Artigo 3: RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE P16<sup>INK4a</sup> E DE Ki 67 EM EPITÉLIO CERVICAL UTERINO NORMAL, DISPLÁSICO E NEOPLÁSICO E INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).**

Mylius, L.C.M<sup>1,2</sup>., Edelweiss, M.I.A.<sup>1,4</sup>, Meurer, L<sup>4</sup>., Igansi, C.N.<sup>3</sup> & Bozetti, MC<sup>1,3</sup>

1. Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas, 2.Faculdade de Farmácia, 3.Programa de Pós graduação em Epidemiologia, 4.Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Fonte Financiadora: Fipe, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS- Brasil**

**EXPERIMENTAL AND MOLECULAR PATHOLOGY**

## Resumo

O Papilomavírus Humano (HPV) é o principal fator etiológico do câncer cervical, responsável por cerca de 99,0% das neoplasias uterinas. Proteínas do ciclo celular como a p16<sup>INK4a</sup> e o antígeno nuclear de proliferação Ki67 têm sido empregadas como marcadores celulares de oncogenicidade. As oncoproteínas E6 e E7 interagem com genes supressores tumorais p53 e pRb, culminando com a superexpressão de p16<sup>INK4a</sup>. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de DNA-HPV em 176 biópsias cervicais e relacionar os diferentes graus histológicos com a expressão imuno-histoquímica (IHQ) de p16<sup>INK4a</sup> e Ki67. A presença do DNA-HPV foi observada em 75,0% das pacientes testadas, sendo 38,2% positivas para os tipos virais de alto risco analisados (16,18 e 31). Quanto à p16<sup>INK4a</sup>, verificou-se a expressão em 69,5% das amostras, sendo esta expressa em 100,0% das neoplasias malignas. A expressão de Ki67 foi estatisticamente significativa na associação com o grau da lesão, sendo mais expressa nas lesões mais graves. A co-expressão dos marcadores p16<sup>INK4A</sup> e Ki67 foi presente em 86,5% das amostras ( $p < 0.001$ ) sendo que o percentual de expressão foi maior nas lesões de alto grau e câncer ( $p < 0.001$ ). Estes resultados sugerem uma forte associação entre a presença de infecção pelos HPV-AR testados e a superexpressão de p16<sup>INK4a</sup> e Ki67.

## **Introdução**

O câncer cervical é a segunda causa de malignidade entre mulheres no mundo, sendo considerada causa de morbidade e mortalidade (Astbury K et al., 2006). A infecção persistente pelo Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco (AR) representa o principal fator de risco associado à carcinogênese cervical, sendo observado em até 99,0% dos casos (Valgareva et al., 2004; Longatto Filho et al., 2005; Tsay et al., 2005).

Acredita-se que na população em geral mais de 40,0% das mulheres são infectadas por HPV-AR em algum momento na vida, sendo que 25,0% destas desenvolvem infecções persistentes e um terço poderá evoluir para lesão intra-epitelial de alto grau em 5-6 anos após a infecção inicial (Hampl et al., 2007).

Os critérios cito-morfológicos para o diagnóstico das lesões pré-neoplásicas apresentam grande variabilidade inter e intra-observador, justificando a necessidade de se aliar marcadores imuno-histoquímicos (IHQ) para a otimização diagnóstica (Keating et al., 2001).

Nos últimos anos, estudos têm demonstrado que importantes fatores contribuem para o processo de transformação maligna (Castellsagué X et al., 2002; Yokoyama M et al., 2003; Wright JD et al., 2005). Além da infecção viral, entre estes fatores podemos citar a maior susceptibilidade do hospedeiro e a propagação clonal de células neoplásicas (Hampl et al., 2007).

Em células normais, a atividade das quinases dependentes de ciclina (CDKs), proteínas controladoras do ciclo celular, é regulada pelos inibidores de CDKs, incluindo a p16<sup>INK4a</sup>, que atua como supressora tumoral inibindo a CDK4 e CDK6 que fosforilam a proteína do retinoblastoma (pRb). A perda da função da p16<sup>INK4a</sup> é análoga à inativação de pRb em células com imortalidade induzida por vírus, como por exemplo o HPV (Munro et al., 1999).

A quebra do DNA-HPV no momento da integração no genoma do hospedeiro entre as regiões E1 e E2 do genoma viral, aumentando a expressão dos genes transformadores E6 e E7 (Munger et al., 2004; Queiroz et al., 2006). A oncoproteína E6 interage com o gene supressor tumoral p53, inativando-o; já a proteína E7, interage com a proteína do retinoblastoma (pRb), induzindo a liberação do fator de transcrição E2F e estimula a progressão à fase S do ciclo celular, causando o aumento dos níveis de expressão do inibidor da quinase dependente de ciclina, p16<sup>INK4a</sup> (Propioleck et al., 2004; Queiroz et al., 2006; Horn et al., 2006). Assim, a indução da proteína p16<sup>INK4a</sup> é um fator presente nas lesões pré-malignas e malignas causadas pelo HPV no colo uterino e tem sido considerado um marcador de displasia, superexpresso nestas lesões (Kim et al., 1998; Van de Pute et al., 2004; Ekalaksananan et al., 2006, O'Neill et al., 2006).

Vários autores têm descrito o papel da p16<sup>INK4a</sup> nas neoplasias de colo uterino, para confirmar resultados citológicos equívocos, pela sua importância aliada ao teste de DNA-HPV, como ferramenta diagnóstica, ou na análise prognóstica das lesões (Rüdger et al., 2002; Van de Putte et al., 2003; Volgareva et al., 2004; Longatto Filho et al., 2005; Jeong et al., 2006; Ekalaksananan et al., 2006; Queiroz et al., 2006; Rocha A et al., 2007).

A atividade da p16<sup>INK4a</sup> tem sido estudada em outros tipos tumorais ou mesmo aliada a outros marcadores para elucidar diagnósticos (Keating et al., 2001; Walts et al., 2006; Samama et al., 2006; Horn et al., 2006; Liang, et al., 2007). Esta proteína também tem sido relacionada a mecanismos genéticos como mutação, hipermetilação ou perda de heterozigosidade, os quais estariam envolvidos na sua inativação (Park et al., 2001; Virmani et al., 2001; Yang et al., 2004; Volgareva et al., 2004).

A expressão de Ki67 tem sido relatada por diferentes autores em vários tipos de lesões malignas, como vulva, pênis, mama, esôfago e cérvix uterina, indicando a presença de atividade mitótica (Hong et al., 1995; Fernandes et al., 2002; Koyamatsu et al., 2003; Agoff, et al., 2003; Longatto Filho et al., 2005). O Ki-67 é um antígeno de proliferação celular, não-histona, presente no núcleo da célula o qual é expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0 (Walts et al., 2006). A expressão de Ki67 no terço superior da camada basal do epitélio metaplásico é um evento que ocorre em lesões ativas e é um forte preditor de proliferação e progressão, aumentando sua expressão paralelamente com a agressividade da lesão (Longatto Filho et al., 2005).

Com objetivo de verificar a expressão dos marcadores p16<sup>INK4a</sup> e Ki67 em diferentes graus de lesões cervicais foram analisadas biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas em dois Hospitais da Rede Pública de Porto Alegre, região Sul do Brasil, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e Grupo Hospitalar Conceição (GHC).

## **Material e Métodos**

Este é um estudo com delineamento transversal que arrolou um total de 174 mulheres que realizaram biópsia de colo uterino entre fevereiro de 2003 e dezembro de 2006. Um fluxograma da origem destas amostras é apresentado na Figura 1. Todas apresentaram o diagnóstico histopatológico realizado no centro de origem.

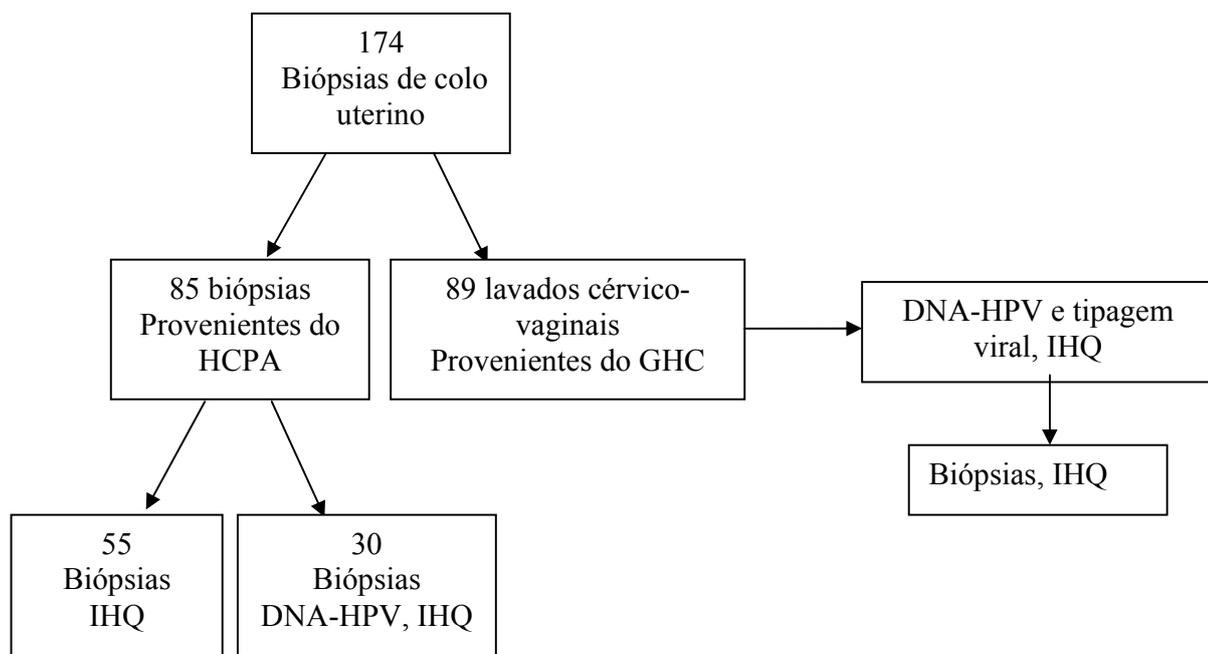


Fig. 1: Fluxograma de obtenção das amostras deste estudo

### ***Amostras***

Na amostra de mulheres proveniente do GHC (89) foi realizado o teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificação da presença ou não de DNA-HPV em material coletado do colo uterino e estocado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a extração do DNA. As amostras DNA-HPV positivas foram tipadas para os HPV-AR mais prevalentes (HPV-16, -18 e -31).

Na amostra do HCPA (85), 30 mulheres foram pesquisadas apenas para presença de DNA-HPV pela técnica da PCR e IHQ e 55 apenas pela técnica de IHQ.

### ***Extração de DNA-HPV***

A extração de DNA das amostras de lavado cérvico-vaginal das 89 pacientes do GHC e das amostras do HCPA foi realizada de acordo com o protocolo de Proteinase K (Sambrook J. et al., 1999).

A técnica foi direcionada para o gene L1 e os *primers* empregados foram My09 e My11. As condições da PCR foram descritas por Bauer HM et al (1993) e Coutlée F et al (2002). Para o controle interno da reação de PCR, *primers* de  $\beta$ -globina foram empregados nestas reações para verificar a viabilidade do DNA testado. (Bauer & Manos, 1993).

### ***Pesquisa dos tipos oncogênicos mais frequentes***

Todas as amostras positivas na triagem DNA-HPV das 89 pacientes do GHC foram tipadas para os AR mais frequentes (HPV-16, -18 e -31), utilizando-se *primers* específicos correspondentes à região E6 e E7 do genoma viral. As condições de amplificação e os *primers* utilizados estão baseados na metodologia descrita por Cuzick *et al* (1994) (Tabela I):

Tabela 1: *Primers* e condições de amplificação por PCR

<b>Tipos Virais</b>	<b>Sequências</b>	<b>Ta<sup>a</sup> (°C)</b>
<b>HPV-16</b>	5'...GC GAT CCT GTC TGC TTT TAT ACT AA...3' (sense)	54°C
	5'...AAG CC AAC TAA ATG TCA C...3' (antisense)	
<b>HPV-18</b>	5'...TGC AGC ACG AAT GGC ACTGGC CTG...3' (sense)	70°C
	5'...CAC GGC GAC CCT ACA AGC TAC CTG...3' (antisense)	
<b>HPV-31</b>	31A 5'...TACCTGTGTTTCTGTTAAC...3' (sense)	52°C
	31S 5'...AGAAAGACCTCGGAAATTG...3' (antissense)	

<sup>a</sup>Temperatura de Anelamento

Para o controle das reações, foi ensaiado para cada PCR de DNA de amostras clínicas, um controle positivo de reação, que consistiu em um fragmento de 450pb correspondente às células Caski e SiHa (células infectadas com o vírus HPV) e um controle negativo de reação sem a presença de qualquer DNA. Em todas as amostras clínicas foi realizado um PCR multiplex utilizando primers My09/My11(correspondente ao gene L1 do do genoma viral do HPV e primers complementares ao gene da  $\beta$ -globina humana (gH20 e PC04) [32]. Os primers de  $\beta$ -globina foram empregados nestas reações para verificar a viabilidade do DNA testado.

### ***Biópsias***

Após a seleção dos blocos de parafina das biópsias, novas lâminas foram preparadas e coradas pela técnica da hematoxilina-eosina para a revisão histológica, que foi realizada por patologista treinado (MIE) (Jalava P et al., 2006).

### ***Imuno-histoquímica (IHQ)***

As 174 biópsias cervicais, fixadas em formalina, embebidas em parafina foram cortadas (4 $\mu$ m de espessura) e desparafinizadas em xileno, seguidas de rehidratação. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram aquecidas em tampão citrato pH 6,0 em forno micro-ondas por 20 minutos. Os cortes foram deixados à temperatura ambiente e lavados com tampão-fosfato três vezes por 5 minutos cada. Após o bloqueio da peroxidase endógena, os cortes foram rehidratados e as lâminas foram submetidas ao processo de imuno-histoquímica (Mills B, 1992; Santos RTM et al, 1999).

Para a determinação da expressão da P16<sup>INK4A</sup> foi utilizado o anticorpo p16<sup>INK4A</sup> (Neomarkers Ab-7, clone 16P07, cat#AP-9003, Califórnia, USA) empregando a técnica acima descrita. As colorações citoplasmática e nuclear foram avaliadas e consideradas positivas para a

expressão da p16<sup>INK4a</sup>. A intensidade de expressão foi graduada conforme Bulten et al. (2006) que consideraram negativo (-), se nenhuma célula expressou coloração, positivo (+) se o percentual de células que expressaram variou de 1-25,0%, positivo (++) se o percentual variou de 26-75,0% e positivo (+++) se mais de 75,0% das células foram coradas. O padrão de expressão também foi avaliado e considerado focal se a expressão estava concentrada em algumas áreas e, difuso, se a expressão estava distribuída por toda a lâmina.

O anticorpo Ki67, clone MIB-1 (DAKO, Glostrup, Denmark), foi incubado por 12 horas, a 4 °C, na diluição 1:200, seguido da aplicação do complexo-estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako), revelação com diaminobenzidina tetraidroclorido (Kit DAB, Dako) e contrastado com hematoxilina. A reação teve como controle positivo para Ki67 um corte contendo linfonodo com hiperplasia reacional, sendo o controle negativo realizado no mesmo tipo de amostra sem o anticorpo primário. Foi considerada expressão positiva para Ki67 a coloração nuclear acima de 5,0% das células da camada basal.

### ***Variáveis do Estudo***

Os desfechos do estudo foram o diagnóstico histopatológico das lesões do colo uterino, a tipagem do DNA-HPV e/ou HPV-AR (HPV-16,-18 e -31). Os resultados do exame histopatológico foram categorizados em normal, lesão de baixo grau (LSIL), lesão de alto grau (HSIL) e câncer invasor. Na categoria LSIL foram incluídos os resultados com diagnóstico de neoplasia intra-epitelial-cervical grau 1 (NIC I) e na categoria HSIL, os achados com diagnóstico de neoplasia intra-epitelial cervical graus 2 e 3 (NIC II , III) e câncer invasor. Os resultados de DNA-HPV foram classificados em duas categorias: presença ou ausência de HPV e/ou HPV-AR. As expressões de P16<sup>INK4a</sup> e Ki67 foram relacionadas com estes desfechos.

### ***Controle de Qualidade dos Dados***

Todas as informações foram armazenadas em um banco de dados com dupla digitação. Um total de 20,0% dos questionários foi selecionado aleatoriamente e conferidos com os originais para verificar possíveis erros e incongruências.

### ***Análise Estatística***

Para a comparação das variáveis categóricas utilizou-se o teste Qui-Quadrado ou Teste Exato de Fischer quando indicado. As variáveis contínuas foram analisadas através do teste *t* de Student e ANOVA. Foram considerados significativos os achados com valor de  $p \leq 0,05$ . Para análise dos dados foi utilizado o programa SPSS versão 13.0.

### **Resultados**

As mulheres estudadas apresentaram uma idade média de  $38,5 \pm 13,2$  anos. Ao estratificar-se de acordo com o grau histológico da lesão, observou-se que a idade média das mulheres sem alteração ao exame anatomopatológico foi  $45,6 \pm 14,7$  anos, naquelas com lesão de baixo grau, a média foi  $34 \pm 12,5$  anos. Já, para as portadoras de lesão de alto grau, a média foi  $28,2 \pm 11,7$  anos e nas mulheres com câncer a média foi  $41 \pm 7,2$  anos.

### ***Análise de HPV-DNA***

Do total de pacientes, 68,4% (119/174) tinham resultado para pesquisa de DNA-HPV, sendo que 87,4% (104/119) eram positivas. Em 75,0% (89/119) das pacientes que realizaram DNA-HPV foi feita tipagem para DNA-HPV-AR (-16, -18, -31) sendo 38,2% (34/89) positivas. Houve uma associação estatisticamente significativa entre a presença de DNA-HPV ( $p=0,01$ ) e DNA-HPV-AR testados ( $p<0,001$ ) e o grau de lesão histológica (Tabela 2).

**Tabela 2. Distribuição da freqüência do diagnóstico anatomopatológico de acordo com a presença de HPV-DNA e/ou HPV-DNA-AR.**

<b>Anatomopatológico</b>	<b>N</b>	<b>HPV-DNA +</b>	<b><i>p</i>*</b>	<b>HPV-DNA-AR (%)</b>	<b><i>p</i>*</b>
Normal	62	24 (38,7%)		08 (33,3%)	
Baixo grau	78	72 (92,3%)	0,01	22 (28,2%)	<0,001
Alto Grau	08	08 (100%)		04 (50,0%)	
Câncer	26	NR		NR	
Total	174	104		34	

**NR – não realizado; DNA-HPV-AR – DNA de HPV de alto risco;**

**\* valor de *p* – teste  $\chi^2$  para HPV-DNA e/ou HPV-DNA-AR versus diagnóstico anatomopatológico**

**N= nº de pacientes; HPV-DNA: presença de DNA-HPV**

### ***Expressão de p16<sup>INK4a</sup>***

Considerando as 174 biópsias avaliadas para a expressão de p16<sup>INK4a</sup> independente do diagnóstico anatomopatológico, verificou-se que esta foi expressa em 69,5% (121/174), e destas, 83,5% (101/121) apresentaram padrão difuso e 16,5% (20/121) padrão focal.

Entre as amostras DNA-HPV positivas (104/119), 79,8% (83/104) expressaram p16<sup>INK4a</sup> no núcleo e/ou no citoplasma e esta associação foi estatisticamente significativa ( $p=0,009$ ; OR=4,52; IC95%: 1,47-13,87). Entre as mulheres positivas para DNA-HPV-AR, 85,7% (29/34) expressaram p16<sup>INK4a</sup>, sendo a intensidade de expressão de moderada à forte em 52,0% ( $p=0,01$ ; OR=2,98; IC95%:1,31-6,82) e padrão difuso em 62,0% dos casos ( $p=0,47$ ; OR=1,65; IC95%: 0,60-4,56). Em relação à presença de HPV-16, observou-se uma associação estatisticamente significativa ( $p=0,007$ ) com a expressão de p16<sup>INK4a</sup>, sendo esta expressa em 100,0% dos casos (16/16).

A tabela 3 descreve a associação entre o diagnóstico anatomopatológico e a expressão de p16<sup>INK4a</sup>. Houve uma maior expressão desta proteína nas lesões de alto grau e esta associação foi estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). O mesmo foi observado em relação à intensidade de expressão de p16<sup>INK4a</sup> de moderada à forte ( $p < 0,001$ ) e quanto ao padrão difuso ( $p < 0,001$ ).

A expressão de p16<sup>INK4a</sup> em relação à presença de DNA-HPV foi analisada de acordo com sua intensidade e com o padrão de expressão. A intensidade foi moderada à forte em 59,0% das biópsias DNA-HPV positivas e, em 13,0% das negativas ( $p = 0,004$ ). Quanto ao padrão, este foi difuso em 66,0% das amostras HPV positivas e em 33,0% das negativas. Para os tipos virais de alto risco, esta associação também foi estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ; OR=7,02; IC95%: 2,48-19,90). A figura 2 ilustra a expressão imuno-histoquímica da p16<sup>INK4a</sup>.

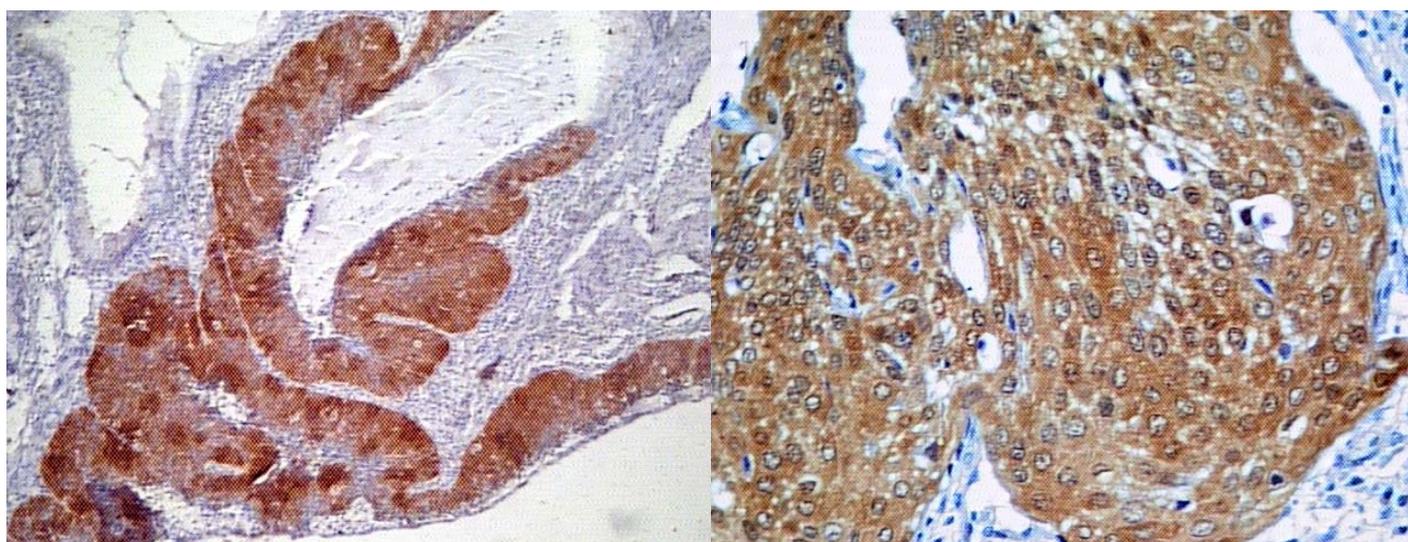


Fig 2. Expressão forte e difusa de p16<sup>INK4a</sup> em caso de lesão de alto grau (A=100x, B=400x)

Tabela 3. Expressão de p16<sup>INK4a</sup> de acordo com o diagnóstico anatomopatológico

Variáveis	Diagnóstico Anatomopatológico					p*
	Normal (62) N (%)	Baixo Grau (78) N (%)	Alto Grau (8) N (%)	Câncer (26) N (%)	Tota l N	
<b>Expressão de p16<sup>INK4a</sup></b>	26 (41,9)	62 (79,5)	7 (87,5)	26 (100)	121	<0,001
<b>Intensidade de Expressão Moderada à Forte (%)</b>	14 (22,6)	43 (55,1)	7 (87,5)	25 (96,2)		
<b>Padrão de Expressão</b>						
Difuso	17 (65,4)	51 (82,3)	6 (87,5)	26 (100)		
Focal	9 (34,6)	11 (17,7)	1 (12,5)	0 (0)		

\* Valor de p -Teste  $\chi^2$

### ***Expressão de Ki67***

Entre as amostras positivas para DNA-HPV, 87,4% (104/119), 36,1% (43/104) expressaram o marcador Ki67 ( $p=0,78$ ; OR=1,41, IC95%: 0,45-4,42). A expressão de Ki67 foi observada em 47,0% (16/34) das amostras positivas para HPV de alto risco ( $p=0,19$ ; OR= 1,99, IC95%: 0,82-4,81).

A Tabela 4 descreve a expressão de Ki67 em relação ao diagnóstico anatomopatológico e esta associação foi estatisticamente significativa ( $p<0,001$ ).

**Tabela 4. Expressão de Ki67 de acordo com o diagnóstico anatomopatológico em 74 biópsias**

Variáveis	<i>Diagnóstico Anatomopatológico</i>			
	Normal (62) N (%)	Baixo Grau (78) N (%)	Alto Grau (8) N (%)	Câncer (26) N (%) <b>p&lt;0,001</b>
<i>Expressão de Ki67</i>	19 (31,0)	28 (35,9)	8 (100,0)	19 (73,0)

\* Valor de  $p$  -Teste  $\chi^2$

### ***Co-expressão de p16<sup>INK4a</sup> e do antígeno Ki67***

A co-expressão dos marcadores p16<sup>INK4A</sup> e Ki67 foi observada em 86,5% (64/74) das amostras ( $p<0,001$ ; OR= 4.83; IC95%: 2,24-10,48) (Tabela 5).

**Tabela 5. Co-expressão de p16<sup>INK4a</sup> e do antígeno de Ki67 em 74 biópsias**

Variáveis	Expressão de p16 <sup>INK4a</sup>		
	Positivo N (%)	Negativo N (%)	p*
<b>Expressão de Ki67</b>			
Positivo	64 (86,5)	10 (13,5)	<0,00 1
Negativo	57 (57,0)	43 (43,0)	

\* Foi considerado positivo quando ocorriam 5 ou + células com núcleos positivos para Ki67.

A Tabela 6 descreve o percentual de células que expressaram os dois marcadores, observando a relação entre a quantidade de células que expressaram Ki67 e p16<sup>INK4a</sup>, e, verifica-se que à medida que aumenta a expressão de p16<sup>INK4a</sup> aumenta também, o percentual de células que expressam Ki67. A Tabela 7 apresenta a relação de expressão dos dois marcadores, considerando o grau histológico. Nesta tabela observa-se que o percentual de expressão de ambos os marcadores foi maior nas lesões de alto grau e câncer ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 6. Descrição do percentual de células que expressaram ou não os marcadores**

Variáveis	Expressão de p16 <sup>INK4a</sup> Quantidade de Células Expressas				p*
	Sem Expressão N (%)	≥ 1 à ≤ 10 N (%)	> 10 à ≤ 50 N (%)	> 50 N (%)	
<b>Expressão de Ki67</b>					
Positivo	10 (13,5)	1 (1,3)	7 (9,5)	56 (75,7)	<0,00 1
Negativo	43 (43,0)	3 (3,0)	16 (16,0)	38 (38,0)	

\* Valor de p -Teste  $\chi^2$

**Tabela 7. Distribuição da frequência da co-expressão de p16<sup>INK4a</sup> e Ki67 de acordo com o grau histológico das lesões**

Variáveis	Avaliação Anatomopatológica				p*
	Normal (62) N (%)	Baixo Grau (78) N (%)	Alto Grau (8) N (%)	Câncer (26) N (%)	
<i>Co-Expressão de p16<sup>INK4a</sup> e Ki67</i>	13 (21,0)	25 (32,0)	7 (87,5)	19 (73,0)	<0,001

\* Valor de p -Teste  $\chi^2$

### Discussão

O estudo de diferentes etapas da carcinogênese em um modelo que inclui estágios precoces do desenvolvimento do câncer tem implicações clínicas importantes. No câncer do colo uterino, nem sempre as alterações precoces precedem aquelas do câncer em estágio mais avançado. Este fato tem levado vários pesquisadores a monitorar a evolução destas lesões por acompanhamentos periódicos através da citologia, colposcopia e biópsia (Kinney WK et al., 1998; Manos M et al., 1999; Nieh S et al., 2003; Tu SP et al., 2005). Embora dentro de um contexto geral, a infecção pelo HPV possa levar a lesões invasoras, esse fato pode ser prevenido pelo estudo histopatológico criterioso das lesões pré-neoplásicas. É de extrema importância a busca por parâmetros mais objetivos que estejam associados com as lesões precoces e que possam refletir a progressão para malignidade. Este estudo teve como objetivo verificar a expressão de p16<sup>INK4A</sup> e Ki67 em diferentes graus histológicos de lesões cervicais e associar esta expressão à presença de DNA-HPV e DNA-HPV-AR mais frequentes. A presença do vírus, bem como sua associação com lesões cervicais tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores (Keating et al., 2001; Park et

al., 2003; Longatto Filho et al., 2005; Schlecht et al., 2006; Oliveira et al., 2006; Hampl et al., 2007). Apesar de este fato ser relevante e já bem documentado, em alguns casos, o DNA-HPV não pode ser demonstrado ou, mesmo na presença do vírus, algumas pacientes apresentam padrões prognósticos diversos, com grande variação no tempo e na extensão da doença. Para elucidar essas variações, outros fatores de risco e alguns marcadores moleculares têm sido estudados nas últimas décadas (Meekin GE et al., 1992; Ho GY et al., 1994; Kristiansen E et al. 1994).

O perfil epidemiológico das pacientes deste estudo revela uma idade média de 34 anos para portadoras de lesão de baixo grau, 28 anos para aquelas com lesão de alto grau e 41 anos para aquelas com diagnóstico de câncer. Este achado difere do que foi descrito por Misra J et al (2006) e Yoshida T et al. (2007) que sugerem uma progressão relativamente lenta das lesões cervicais, sendo as lesões mais graves observadas em idades mais avançadas. O mesmo não foi observado em um estudo realizado por Ishikawa et al. (2006), que verificou o predomínio das lesões de alto grau em mulheres com idade entre 30-39 anos. Uma explicação para estes achados poderia ser a distribuição etária da população estudada que inclui maior proporção de jovens, bem como, pelo padrão de comportamento sexual, sugerindo uma maior exposição destas e, conseqüentemente maior risco deste tipo de lesão nestas pacientes.

A progressão das lesões de baixo grau, em geral mais comum com HPV-AR, é geralmente acompanhada da integração viral à célula hospedeira. Neste estudo, curiosamente observa-se que nas lesões de baixo grau há um predomínio de DNA-HPVs-AR. Este achado ressalta a importância do acompanhamento destas pacientes já que estas lesões têm um maior potencial à progressão para lesões de alto risco com a passagem do tempo. Este fato corrobora os resultados descritos por outros autores (Kim et al., 1998; Alexandrova et al., 1999; Chan et al., 2002; Isaka

K, 2004; Herrero, R, 2005; Sichero L, 2007). Estes autores sugerem que a presença do vírus AR está fortemente associada às lesões precursoras de câncer de colo uterino. Em adição, os tipos virais de alto risco estudados (HPV-16, -18 e -31) também têm sido descritos por outros autores como associados a lesões intra-epiteliais potencialmente ativas (Ishikawa et al., 2006; Queiroz et al., 2006, Samama et al., 2006).

Neste estudo, o HPV-16 foi observado em 23,9% e o HPV-31 foi o segundo tipo mais detectado. De acordo com alguns investigadores estes tipos virais estão relacionados a lesões mais graves e também a uma expressão mais intensa de p16<sup>INK4a</sup> (Alexandrova et al., 1999; Chan et al., 2002; Juneja A et al., 2003; Ishikawa et al., 2006; Hampl et al., 2007).

A P16<sup>INK4a</sup> é uma proteína codificada pelo gene CDKN2A, localizado no cromossomo 9p21 que codifica também a p14<sup>ARF</sup>, uma proteína supressora tumoral que exerce seu efeito na rota da p53 (Kong et al., 2006, Astbury et al., 2006). A p16<sup>INK4a</sup> atua como proteína supressora tumoral através da inibição das quinases dependentes de ciclina 4 e 6, as quais fosforilam pRb, e sua expressão vem sendo empregada pela sua alta sensibilidade e especificidade de detecção das lesões ativas, causadas por HPV-AR. Neste caso, as oncoproteínas virais ao integrarem a célula hospedeira, desestabilizam o genoma viral provocando a perda de E2, aumento da expressão de E6 e E7, desregulando o ciclo celular (Motoyama et al., 2004, Yoshida et al., 2007). Desta forma, a atividade das proteínas supressoras tumorais p53 e pRb, depletados pelas oncoproteínas E6 e E7 respectivamente, por efeito feed-back positivo contribuem para uma maior expressão da proteína inibidora da quinase dependente de ciclina, p16<sup>INK4a</sup>. Verifica-se nestes casos uma menor vigilância nos “pontos de checagem” do ciclo celular, tanto em G1 como na fase M. A expressão imuno-histoquímica e seu acúmulo nas células epiteliais do colo uterino podem ser expressos no citoplasma ou no núcleo (Motoyama et al., 2004, Yoshida et al., 2007).

A expressão de p16<sup>INK4a</sup> esteve presente em 69,5% das biópsias, em especial nas pacientes HPV positivas (104/119). Nossos resultados mostram uma alta prevalência de expressão de p16<sup>INK4a</sup> entre as amostras DNA-HPV positivas; 79,8% (83/104) expressaram este marcador no núcleo e/ou no citoplasma e esta associação foi estatisticamente significativa ( $p=0,009$ , OR= 4,52; IC95%: 1,47-13,87). Já entre as mulheres positivas para DNA-HPV-AR, 85,7% (29/34) expressaram p16<sup>INK4a</sup>, sendo a intensidade de expressão de moderada à forte em 52,0% ( $p=0,01$ , OR 2,98; IC95%:1,31-6,82) fato também estatisticamente significativo. Em relação à presença de HPV-16, tipo mais freqüente na carcinogênese cervical, observou-se uma associação estatisticamente significativa ( $p=0,007$ ) com a expressão de p16<sup>INK4a</sup>, sendo esta expressa em 100,0% dos casos (16/16).

Estes achados estão de acordo com outros estudos, os quais demonstraram que a presença de HPV-AR está fortemente associada à inativação de pRb e expressão de p16<sup>INK4a</sup> e, conseqüentemente associadas à presença do tipo 16, que é o mais comumente encontrado em nosso meio (Kruse et al., 2004; Tsai et al., 2005; Samama et al., 2006).

No que diz respeito à expressão da proteína p16<sup>INK4a</sup>, em relação ao diagnóstico anatomopatológico verificou-se uma maior expressão e intensidade, bem como o padrão difuso nas lesões de alto grau e câncer. Comparativamente entre os tipos de diagnóstico histopatológico e a expressão de p16<sup>INK4a</sup>, todos os valores mostraram significância estatística, conforme a Tabela 3. Na maioria das amostras de nosso estudo o padrão de expressão foi difuso (83,5%) enquanto apenas 16,5% foi focal. Essas freqüentes alterações podem representar um maior risco de desenvolvimento de câncer em mulheres deste estudo e nas brasileiras em geral onde cerca de 30,0% das pacientes podem progredir para o câncer cervical (Cavalcanti SMB et al., 1996). Este resultado está de acordo com o descrito por outros investigadores (Ekalaksananan al., 2006;

Lambert et al., 2006). Considerando-se que os exames de PCR são mais trabalhosos, alguns investigadores usam a IHQ como um teste de rastreamento e a coloração nuclear e/ou citoplasmática na biópsia, pode ser considerada um marcador promissor para as alterações celulares, mesmo sem os testes confirmatórios de DNA-HPV. Entretanto, a técnica de IHQ pode ser falsamente positiva, devido à presença de anticorpos instáveis, com validade ultrapassada, recuperação antigênica incompleta, ligações inespecíficas com proteínas do hospedeiro ou com proteínas virais (Greenblat MS et al., 1994). Assim, poucos casos podem representar resultados falsos positivos, embora a maioria das vezes, a expressão de p16<sup>INK4a</sup> seja bastante sensível e específica nas lesões. Ainda em outras situações usando anticorpos monoclonais, certas condições podem levar a resultados falsos negativos, como quando um epítipo que poderia ser reconhecido pelo anticorpo está inacessível por ligações com outras proteínas inespecíficas, resultando em coloração negativa. Estes eventos podem ser prevenidos com o uso de lâminas de controle, sabidamente positivas, processadas em conjunto com o grupo de lâminas testadas (Greenblat MS et al., 1994). Em nosso estudo este procedimento foi executado, excluindo essas possibilidades e não foram encontrados casos negativos para p16<sup>INK4a</sup> com a presença de lesão histológica.

Houve expressão de p16<sup>INK4a</sup> em um percentual de amostras com histologia normal. Esse fato pode sugerir a presença de infecção por HPV, em especial, de outros tipos de alto risco não testados nesta pesquisa, no início das alterações do ciclo celular. Conforme sugerido por Lambert et al. (2006), a expressão da proteína também pode ocorrer na ausência de infecção viral, inativação de pRb e por mecanismo independente de HPV. Entretanto, a ausência de alterações anatomopatológicas pode ocorrer em virtude de dificuldades diagnósticas, pela presença de alterações tênues que ocorrem no início do processo, quando a detecção ainda é difícil ou não

visualizável pela colposcopia, pela citologia e ou biópsia com material inadequado. Embora a expressão de p16<sup>INK4a</sup> e a presença de DNA-HPV estejam associadas às lesões de baixo grau ou em alterações reativas, passíveis de regressão espontânea, Negri G et al. (2004) verificaram um aumento da probabilidade de progressão das lesões de baixo grau ou da persistência viral em mulheres com padrão difuso de p16<sup>INK4a</sup>. Os achados deste estudo apresentam também um predomínio deste padrão nas lesões, o que justificaria um acompanhamento destas mulheres, já que estas têm um risco potencialmente elevado de progredir para lesões mais graves (Ekalaksananam et al., 2006).

A expressão do antígeno nuclear Ki67 está presente em células proliferativas do ciclo celular e ausente na fase G0 (repouso). Sua presença tem sido estudada em muitos tipos de neoplasias incluindo cólon-reto, bexiga e mama, onde é usado como um índice de proliferação celular substituindo o exaustivo método de contagem de mitoses. Aqui, foi estudada a expressão de Ki67 com anticorpo monoclonal MIB-1, o qual detecta as células em mitose em cortes embebidos em parafina, com o objetivo de avaliar se lesões mais graves poderiam ter um índice de proliferação maior e, então sugerir, uma provável evolução para neoplasia invasiva. Encontramos 74 casos (42,5%) com expressão de Ki67 entre os 174 casos estudados. Na avaliação por diagnóstico histopatológico essa positividade revelou ser mais importante nas lesões de alto grau (100,0%) e no carcinoma invasor (73,0%), e as correlações foram estatisticamente significativas, como pode ser visto na Tabela 3.

O antígeno de proliferação celular Ki67 tem sido citado em alguns estudos como tendo sua expressão aumentada em lesões proliferativas, sendo indicado como marcador prognóstico em tumores (Keating et al., 2001; Carrilho et al., 2003; Sarian et al., 2006; Queiroz C et al., 2006). A imunopositividade para Ki67 reflete uma ação entre a atividade proliferativa, grau de neoplasia

intra-epitelial cervical (NIC) e a presença de DNA-HPV. Este antígeno tem aplicação prática na identificação de lesões adjacentes a NIC, separando-as de lesões benignas, como epitélio escamoso atrófico, metaplasia escamosa imatura ou epitélio de transição, nos quais há uma baixa expressão. Esta proteína parece ser importante também na distinção de margens cauterizadas de NIC 3 daquelas não-displásicas (Mc Cluggage, 2006). A positividade nuclear de Ki67 no terço superior do epitélio é um forte indicador de lesão de alto grau; entretanto para as lesões de baixo grau a variabilidade na expressão deste marcador, tanto no número de células quanto na intensidade de expressão é uma causa de erro na interpretação (Keating et al., 2001). A alteração histológica predominante no estudo de Keating et al (2001) foi a LSIL (lesão de baixo grau), geralmente associada à infecção por HPV. Em 2005, Baak e colaboradores, apresentaram um elevado valor preditivo positivo deste marcador para as lesões de baixo grau, que podem progredir. Este fato poderia diminuir os custos para serviços de saúde, evitando tratamentos desnecessários nessas lesões.

Entre as amostras positivas para DNA-HPV (104/119) de nosso estudo, 36,1% (43/104) expressaram o marcador Ki67 ( $p=0,78$ ,  $OR=1,41$ ,  $IC95\%: 0,45-4,42$ ). A expressão de Ki67 foi observada em 47% das amostras positivas para DNA-HPV-AR ( $p=0,19$ ,  $OR= 1,99$ ,  $IC95\%: 0,82-4,81$ ). Esses achados não obtiveram significância estatística.

A expressão de Ki67 apresentou-se maior nas lesões de alto grau, entretanto nas pacientes identificadas como normais, a maioria portadora do DNA-HPV, este marcador também foi expresso. Conforme justificado por Sarian et al (2006), as lesões inflamatórias relacionadas à patogênese das lesões de baixo grau e NIC, podem explicar uma expressão mais elevada de Ki67 em epitélio sem alterações morfológicas e não-proliferativo. Um fator importante foi o ponto de corte para positividade neste estudo ser de 5,0% de células coradas, enquanto em outros estudos

este valor pode ser maior, o que poderia alterar os nossos resultados finais, resultando em mais casos negativos. Essas diferenças podem ser observadas na Tabela 6, na qual estratificamos os graus de positividade em percentagens de células coradas.

Aliar a análise deste marcador a outros já conhecidos como p53, bcl-2 vem sendo estudado como indicadores de prognóstico, o que poderia melhorar a acurácia diagnóstica em patologia cervical. Nesse estudo, observou-se uma associação entre as proteínas Ki67 e p16<sup>INK4a</sup> e o grau da lesão histológica em 64 entre 174 (36,8%), sendo que as lesões mais graves, também apresentaram maior expressão destes marcadores. Esta observação revelou-se estatisticamente significativa.

Observa-se que, na medida em que aumenta o percentual de células que expressam o Ki67, este aumento ocorre também para p16<sup>INK4a</sup>, já que ambos indicam atividade celular, proliferação e provável oncogenicidade. Esta associação parece ocorrer mais frequentemente nas lesões de alto grau e câncer.

A co-expressão dos marcadores p16<sup>INK4a</sup> e Ki67 de acordo com o grau histológico das lesões, demonstrada na Tabela 7 sugere que as lesões HPV-induzidas podem indicar ativação de moléculas que controlam a proliferação celular, como Ki67, a inativação de genes supressores como a p16<sup>INK4a</sup> e a diminuição da apoptose celular, mecanismos demonstrados por Nair et al., 1999 através da relação inversa Bax/bcl-2 em lesões histológicas mais graves. Samama, et al em 2006 demonstraram a negatividade para p16<sup>INK4a</sup> em lesões induzidas pela presença de HPVs de baixo risco, 6 e 11, justificando-se pela ausência de atividade oncogênica da proteína E7 sobre a pRb.

Considerando os altos índices de prevalência da infecção pelo HPV e expressão de p16<sup>INK4a</sup> e Ki67, assim como a co-expressão, propusemos que estes eventos moleculares podem colaborar

para a transformação maligna na carcinogênese cervical. A presença do DNA-HPV e, os consequentes mecanismos de oncogenicidade já propostos em vários estudos (eventos epigenéticos, relacionados a mudanças hereditárias do padrão genético) de hipermetilação, perda de heterozigozidade e outros) (Park et al., 1999; Wong et al., 1999; Yang et al 2004; Jeong DH et al., 2006; induzem a expressão da proteína p16<sup>INK4a</sup> pela inativação do pRB e a expressão do Ki67 pela definição da atividade proliferativa da lesão neoplásica, consequente à infecção pelos tipos virais de alto risco. As células epiteliais que apresentam estas alterações moleculares acumuladas, quando infectadas pelo HPV, podem levar a uma aceleração do processo de progressão para o câncer.

Embora a nossa população de estudo tenha sido em biópsias de colo uterino, já previamente selecionada por alterações citológicas e colposcópicas, nosso estudo sugere uma relação estreita entre presença de HPV-DNA (mais o de alto risco) e expressão maior de p16<sup>INK4a</sup> e Ki67. Os dados epidemiológicos já existentes corroboram os nossos achados (Agoff et al., 2003; Longato-Filho et al, 2005) e mais estudos genéticos, moleculares e de *follow up* (acompanhamento) poderão levar a uma melhor compreensão da patogênese do câncer cervical.

Assim, os achados deste estudo sugerem a importância de instituir na rotina de rastreamento de lesões pré-neoplásicas cervicais, o uso de marcadores moleculares que possa complementar diagnósticos duvidosos, evitando tratamentos desnecessários ou impedindo o manejo de lesões que possam ser potencialmente inativas.

## Referências

- Agoff, S.N., Lin, P., Morihara, J., Mao, C., Kiviat, N.B., Koutsky, L.A., 2003. p16<sup>INK4a</sup> Expression correlates with degree of cervical neoplasia: A comparison with Ki-67 expression and detection of High-risk HPV types. *Mod Pathol.* 16 (7), 665-673.
- Alexandrova, Y.N., Lyshchov, A.A., Safronnikova, N.R., Imyanitov, E.N., Hanson, K.P., 1999. Features of HPV infection among the healthy attendants of gynecological practice in St. Petersburg, Russia. *Cancer Letters* 145 (1-2), 45-48.
- Astbury, K., Martin, C.M., Ring, M., Pilkington, L., Bolger, N., Sheils, O.M., O'Leary, J.J., 2006. Future molecular aspects of cervical cytology. *Cur Diagn Pathol* 2, 104-13.
- Baak, J.P., Kruse, A.J., Janssen, E., van Diermen, B., 2005. Predictive testing of early CIN behaviour by molecular biomarkers. *Cell Oncol* 27 (5-6), 277-80.
- Bauer, H.M., Hildesheim, A., Schiffman, M.H., Glass, A.G., Rush, B.B., Scott, D.R., Cadell, D.M., Kurman, R.J., Manos, M.M., 1993. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis.* 20(5), 274-78.
- Bauer, H.M., Manos, M.M., 1993. PCR detection of genital human papillomavirus. In: Persin, D. (Ed.), *Diagnostic Molecular Microbiology*. American Society for Microbiology, pp. 407-413.
- Bulten, J., van der Avoort, I.A.M., Melchers, W.J.G., Massuger, L.F.A.G., Grefte, J.M.M., Hanselaar, A.G.J.M., de Wilde, P.C.M., 2006. p14<sup>ARF</sup> and p16<sup>INK4A</sup>, two products of the same gene, are differently expressed in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol.* 101, 487-494.

- Coutlee, F., Gravitt, P., Kornegay, J., Hankins, C., Richardson, H., Lapointe, N., Voyer, H., Franco, E. Use of PGMV primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Pathol.* 40(3), 902-7.
- Carrilho, C., Gouveia, P., Cantel, N., Alberto, M., Buane, L., David, L., 2003. Characterization of Human Papillomavirus infection, P53 and Ki67 in cervix cancer of Mozambican Women. *Pathol Res Pract.* 199, 303-11.
- Castellsagué, X.; Bosh, F.X., Muñoz, N., 2002. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* 89, 191-9.
- Cavalcanti, S.M.B., Deus, F.C.C., Zardo, L.G., Frugulhett, J.C.P.P., Oliveira, L.H.S., 1996. Human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil: a retrospective study. *Mem Inst Osw Cruz* 91(4), 433-440.
- Chan, P.K.S., Chang, AR, Cheung, J.L.K., Chan, D.P.C., Xu, L.Y., Tang, N.L.S., Cheng, A.F., 2002. Determinants of cervical Human Papillomavirus infection: Differences between High- and Low- oncogenic risk types. *J Infect Dis.* 185, 28-35.
- Coutlee, F., Gravitt, P., Kornegay, J., Hankins, C., Richardson, H., Lapointe, N., Voyer, H., Franco, E., 2002. Use of PGMV primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Pathol.* 40(3), 902-7.
- Cuzick, J., Terry, G., Ho, L., Hollingworth, T., Anderson, M., 1994. Type specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 69(1), 167-71.
- Ekalaksananan, T., Pientong, C., Sriamporn, S., Kongyingyoes, B., Pensa, P., Kleebkaow, P., Kritpetcharat, O., Parkin, D.M., 2006. Usefulness of combining testing for p16 protein and human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma screening. *Gynecol Oncol.* 103(1), 62-66.

- Fernandes, M.G.M., Ferreira, F.V.A., Ferreira, S.N.H., Lima, S.M.S., Ilha, F.D.R., Ribeiro, A.V.M., Rabenhorst, S.H., Mesquita, S.M., Ferreira, G., Amorin, L.H.M., 2002. MIB-1 and p53 in penile intraepithelial and invasive squamous HPV- related lesions. *Rev Bras de Cancerologia* 48(1), 20-37.
- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., Harris, C.C., 1994. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Review. *Cancer Res.* 54(18), 4855-78.
- Haddad, R.I, 2007. Human Papillomavirus and oropharyngeal câncer. ASCO 2007.
- Hampl, M., Wentzensen, N., Vinokurova, S., von Knebel-Doerberitz, M.; Poremba, C., Bender, H., Kueppers, V., 2007. Comprehensive analysis of 130 multicentric intraepithelial female lower genital tract lesions by HPV typing and p16 expression profile. *J Cancer Res Clin Oncol.*133, 235-245.
- Herrero, R., Castle, P.E., Schiffman, M., Bratti, M.C., Hildesheim, A., Morales, J., Alfaro, M., Scherman, M.E., Wacholder, S., Chen, S., Rodriguez, A.C., Burk, R.D., 2005. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J of Infect Dis.* 191, 1796-807.
- Ho, G.Y., Burk, R.D., Fleming, I., Klein, R.S., 1994. Risk of genital human papillomavirus infection in women with human immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *Int J Câncer* 56(6), 788-92.
- Hong, M.K., Laski, W.B., Herman, B.E., Johnston, M.H., Vargo, J.J., Steinberg, S.M., Allegra, C.J., Johnston, P.G., 1995. Expansion of Ki-67 Proliferative compartment correlates with degree of dysplasia in Barrett's Esophagus. *Cancer.* 75(2), 423-429.

- Horn, L.C., Lindner, K., Szpankiewicz, G., Edelman, J., Hentschel, B., Tannapfel, A., Bilek, K., Liebert, U.G., Richter, C.E., Einkenkel, J., Leo, C., 2006. p16, p14, p53 and Ciclin D1 Expression and HPV analysis in small cell carcinomas of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol.* 25, 182-186.
- Isaka, K., Nishi, H., Osakabe, Y., Miyata, M., Hokamura, M., Nakada, T., Itokasu, O., Takayama, M., 2004. Establishment of a HPV and p53-mutation-negative human cell line (CA) derived from a squamous carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 92, 15-21.
- Jalava P, Kuopio T, Juntti-Patinen L, Kotkansalo T, Kronkviat P. Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki57 immunoreactivity and standardized mitotic index. *Histopathology* 48,674-682.
- Jeong, D.H., Youm, M.Y., Kim, Y.N., Lee, K.B., Sung, M.S., Yoon, H.K., Kim, K.T., 2006. Promoter methylation of p16, DAPK, CDH1, and TIMP-3 genes in cervical cancer: correlation with clinicopathologic characteristics. *Int J Gynecol Cancer* 16, 1234-1240.
- Juneja, A., Sehgal, A., Mitra, A.B., Pandey, A.A., 2003. Survey on a risk factors Associated with cervical Cancer. *Indian J of Cancer* 40, 15-22.
- Kanao, H., Enomoto, T., Ueda, Y., Fujita, M., Nakashima, R., Ueno, Y., Miyatake, T., Yoshizaki, T., Buzard, G.S., Kimura, T., Yoshino, K., Murata, Y., 2004. Correlation between p14<sup>ARF</sup>/p16<sup>INK4A</sup> expression and HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Letters* 213, 31-37.
- Keating, J.T., Ince, T., Crum, C.P., 2001. Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis. *Adv Anat Pathol.* 8, 83-92.

- Kim, J.W., Choo, N.H., Park, S.W., Kim, J.W., 1998. Underexpression of Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* 71, 38-45.
- Kinney, W.K., Manos, M.M., Hurley, L.B., Ransley, J.E., 1998. Where's the High-Grade Cervical Neoplasia? The importance of minimally abnormal Papanicolaou diagnosis. *Obstet Gynecol.* 91, 973-6.
- Klaes, R., Axel, B., Tibor, F., Rüdiger, R., Simon, H., David, K., Dietmar, S., Mark, S., von Knebel Doeberitz, M., 2002. p16<sup>INK4a</sup> immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 26(11), 1389-1399.
- Kong, C.S., Balzer, B.L., Troxell, M.L., Patterson, B.K., Longacre, T.A., 2006. p16<sup>INK4A</sup> immunohistochemistry is superior to HPV in situ hybridization for the detection of high-risk HPV in atypical squamous metaplasia. *Am J Surg Pathol.* 31(1), 33-43.
- Koyamatsu, Y., Yokoyama, M., Nakao, Y., Fukuda, K., Saito, T., Matsukuma, K., Iwasaka, T., 2003. A comparative analysis of human papillomavirus types 16 and 18 and expressing of p53 gene and Ki-67 in cervical, vaginal, and vulvar carcinomas. *Gynecol Oncol* 90, 547-551.
- Kristiansen, E., Jenkins, A., Kristensen, G., Ask, E., Kaern, J., Abeler, V., Lindqvist, B.H., Tropé, C., Kristiansen, B.E., 1994. Human papillomavirus infection in Norwegian women with cervical cancer. *APMIS* 102 (2), 122-8.
- Kruse, A.J., Baak, J.P., Helliesen, T., Kjellevoid, K.H., Robboy, S.J., 2003. Prognostic value and reproducibility of koilocytosis in cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol.* 33(3), 236-9.
- Kruse, A.J., Skaland, I., Janssen, E., Buhr-Wildhagen, S., Klos, J., Arends, M.J., Baak, J.P., 2004. Quantitative Molecular parameters to identify low-risk and high-risk early CIN lesions:

- Role of markers of proliferative activity and differentiation and Rb availability. *Int J Gynecol Pathol.* 23, 100-109.
- Lambert, A.P., Anshau, F., Schmitt, V.M., 2006. p16<sup>INK4A</sup> expression in cervical premalignant and malignant lesions. *Experimental and Molecular Pathol.* 80, 192-196.
- Liang, J., Mittal, K.R., Wei, J.J., Yee, H., Chiriboga, L., Shukla, P., 2006. Utility of p16<sup>INK4a</sup>, CEA, Ki67, P53 and ER/PR in the differential diagnosis of benign, premalignant, and malignant glandular lesions of the uterine cervix and their relationship with Silversberg Scoring System for endocervical glandular lesions. *Int J Gynecol Pathol.* 26, 71-75.
- Logani, S., Lu, D., Quint, W.G.V., Ellenson, L.H., Pirog, E.C., 2003. Low-grade vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia: correlation of histologic features with human papillomavirus DNA detection and MIB-1 immunostaining. *Modern Pathol.* 16(8), 735-41.
- Longatto Filho, A., Utagawa, M.L., Shirata, N.K., Pereira, S.M.M., Namiyama, G.M., Kanamura, C.T., Santos, G da C, de Oliveira, M.A, Wakamatsu, A., Nonogaki, S., Roteli-Martins, C., di Loreto, C., de Castro Ferraz, M.G.M., Maeda, M.Y.S., Alves, V.A., Syrjänen, K. , 2005. Immunocytochemical expression of p16<sup>INK4A</sup> and Ki-67 in cytologically negative and equivocal pap smears positive for oncogenic human papillomavirus. *Int J Gynecol Pathol.* 24 (2), 118-124.
- Mc Cluggage, W.G. 2006. Immunohistochemical and functional biomarkers of value in female genital tract. *Int J Gynecol Pathol.* 25, 101-20
- Meekin, G.E., Sparrow, M.J., Fenwicke, R.J., Tobias, M., 1992. Prevalence of genital human papillomavirus infection in Wellington women. *Genitourin Med.* 68(4), 228-32.
- Mills B (1992). Immunohistochemistry. In: *Laboratory Methods Immunotechnology.* Ed American Registry of Pathology (Washington), 247-255.

- Misra, J.S., Das, V., Srivastava, A.N., Singh, U.; Chhavi. 2006. Role of different etiological factors in progression of cervical intraepithelial neoplasia. *Diagn Pathol* 34(10), 682-5.
- Motoyama, S., Ladines-Llave, C.A., Luis Villanueva, S., Maruo, T., 2004. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci.* 50(1-2), 9-19.
- Munger, K., Baldwin, A., Edwards, K.M., Hayakawa, H., Nguyen, CL, Owens M, Grace M, Huh K., 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 78(21), 11451-60.
- Munro, J., Stott, F.J., Vousden, K.H., Peters, G., Parkinson, E.K., 1999. Role of the alternative INK4A proteins in human keratinocyte senescence: evidence for the specific inactivation of p16<sup>INK4A</sup> upon immortalization. *Cancer Res.* 59(11), 2516-21.
- Nair, P., Nair, M.K., Jayaprakash, P.G., Pillar, M.R., 1999. Decreased programmed cell death in the uterine cervix associated with high risk human papillomavirus infection. *Pathol Oncol Res.* 5, 95-103.
- Negri, G., Vittadello, F., Romano, F., Kasal, A., Rivasi, F., Girlando, S., Mian, C., Egarter-Vigl, E. p16<sup>INK4a</sup> expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. Negri G., 2004. *Virchows Arch.* 445(6), 516-20.
- Nieh, S., Chen, S.F., Chu, T.Y., Lai, H.C., Fu, E., 2003. Expression of p16<sup>INK4A</sup> in Papanicolaou smears containing atypical squamous cells of undetermined significance from the uterine cervix. *Gynecol Oncol.*, 91(1) 201-8..
- Oliveira, L.H., Rossa, M.L., Pereira, C.R., Vasconcelos, G.A., Silva, R.A., Barrese, T.Z, Carvalho, M.O., Abi, G.M., 2006. Human Papillomavirus status and cervical abnormalities

- in women from public and private health care in Rio de Janeiro state, Brazil. *Rev Med trop São paulo* 48(5), 279-285.
- O'Neill, C.J., McCluggage, W.G., 2006. p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol.* 13, 8-15.
- Park, J.S., Dong, S.M., Kim, S.H., Lee, J.Y., Um, S.J., Park, I.S., Kim, S.J., Namkoong, S.E., 2001. Detection of p16 gene alteration in cervical cancer using tissue microdissection and LOH study. *Cancer Letters* 136, 101-108.
- Park, J.S., Rhyn, J.W., Kim, C.J., Kim, H.S., Lee, S.Y., Kwon, Y.I., Namkoong, S.E., Sin, HS, Um S.J., 2003. Neoplastic change of squamo-columnar junction in uterine cervix and vaginal epithelium by exogenous estrogen in HPV-18 URR E6/E7 transgenic mice. *J Gynecol Oncol.* 89, 360-68.
- Popiolek, D., Ventura, K., Mittal, K., 2004. Distinction of low-grade squamous intraepithelial lesions from high-grade squamous intraepithelial lesions based on quantitative analysis of proliferative activity. *Oncol Reports* 11, 687-91.
- Queiroz, C., Silva, T.C., Alves, V.A., Villa, L.L., Costa, M.C., Travassos, A.G., Filho, J.B., Studart, E., Cheto, T., de Freitas, L.A., 2006. Comparative study of the expression of cellular cycle proteins in cervical intraepithelial lesions. *Pathol Res & Pract* 10, 731-37.
- Queiroz, C., Silva, T.C., Alves, V.A., Villa, L.L., Costa, M.C., Travassos, A.G., Filho, J.B., Studart, E., Cheto, T., de Freitas, L.A., 2006. P16INK4a expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract.* 202, 77-83.
- Samama, B., Lipsker, D., Boehmm, N., 2006. P16 expression in relation to human papillomavirus in anogenital lesions. *Hum Pathol.* 37, 513-519.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1999. Appendix E: commonly used techniques in molecular cloning. Purification of nucleic acids. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor, New York, pp. E.3-E.4 (3v).
- Santos, R.T.M., Wakamatsu, A.; Kanamura, C.T.; Nanagaki, S.e Pinto, G.A. 1999. Procedimentos em Imuno-histoquímica e Hibridiação “in situ”. In: *Manual de Imuno-histoquímica*. Eds: Alves, V.A.F.; Bacchi, C.E., Vassalo, J. (SP).p.229-259.
- Sarian, L.O., Derchain, S.F., Yoshida, A., Vassallo, J., Pignataro, F., De Angelo Andrade, L.A.L., 2006. Expression of cyclooxygenase - (COX-2) and Ki67 as relates to disease severity and HPV detection in squamous lesions of the cervix *Gynecol Oncol.* 102(3), 537-41.
- Schlecht, N.F., Trevisan, A., Baggio, M.L., Duarte-Franco, E., Greenberg, M.D., Rohan, T.E., Ferenczy, A., Villa, L.L., Franco, E.L., 2006. Lack of agreement between cervicography and cytology and the effect of human papillomavirus infection and viral load. *J Low Genit Tract Dis.* 10(4), 229-37.
- Sichero, L., Ferreira, S., Trottier, H., Duarte-Franco, E., Ferenczy, A., Franco, E.L., Villa, L.L., 2007. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int J cancer* 120(8), 1763-8.
- Tsai, J.H., Peng, Y.W., Lin, L.Y., Chou, M.C., Chiou, H.L., 2005. An association between human papillomavirus 16/18 deoxyribonucleic acid in peripheral blood with p16 protein expression in neoplastic cervical lesions. *Cancer Detect Prev.* 29, 537-43.
- Tu, S.P., Jackson, S.L., Yasui, Y., Deschamps, M., Hislop, T.G., Taylor VM., 2005. Cancer preventive screening: A cross- border comparisonj of United States and Canadian Chinese women. 41, 36-46.

- Van de Putte, G., Holm, R., Lie, K., Tropé, C.G., Kristensen, G.B.. 2004. Expression of p27,p21, and p16 protein in early squamous cervical cancer and its relation to prognosis. *Gynecol Oncol* 89, 140-147.
- Virmani, A.K., Muller, C., Rathi, A., Zochbauer- Mueller, S., Mathis, M., Gazdar, A.E., 2001. Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 7(3), 584-9.
- Volgareva, G., Zavalishins, L., Andreeva, Y., Frank, G., Krutikova, E., Golovina, D., Blied, A., Spitkovsky, D., Ermilova, V., Kissel'jov, F., 2004. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer* 4, 58-67.
- Walt, A.E., Lechago, J., Bose, S., 2006. P16 and Ki67 immunostaining is a useful adjunct in the assessment of biopsies for HPV-associated anal intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 30(7), 785-91.
- Wong, Y.F., Chung, T.K.H., Cheung, T.H., Nobori, T., Yu, A.L., Yu, J., Batowa, A., Lai, K.W.H., Chang, A.M.Z., 1999. Methylation of p16<sup>INK4A</sup> in primary gynecologic malignancy. *Cancer Letters* 136, 231-35.
- Wright, J.D., Li, J., Gerhard, D.S., Zhang, Z., Huettner, P.C., Powell, M.A., Gibb, R.K., Herzog, T.J., Mutch, D.G., Trinkaus, K.M., Rader, J.S., 2005. Human papillomavirus type and tobacco use as predictors of survival in early stage cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* 98, 84-91.
- Yang, H.J., Liu, V.W.S., Wang, Y., Chan, K.Y.K., Tsang, P.C.K., Khoo, U.S., Cheung, A.N.Y., Nogan, H.Y.S., 2004. Detection of hypermethylated genes in tumor and plasma of cervical cancer patients. *Gynecol Oncol.* 93, 435-40.
- Yokoyama, M., Iwasaka, T., Nagata, C., Nozawa, S., Sekiya, S., Hirai, Y., Kanazawa, T., Sato, S., Hoshiai, H., Sugase, M., Kawana, T., Yoshikawa, H., 2003. Prognostic factors associated

with the clinical outcome of cervical intraepithelial neoplasia: a cohort study in Japan. *Cancer Letters* 192, 171-179.

Yoshida, T., Sano, T., Kanuma, T., Owada, N., Sakurai, S., Fukuda, T., Nakajima, T., 2007.

Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the type distribution, viral load, and physical status of human papillomavirus in liquid-based cytology samples from cervical lesions.

*Int J Gynecol Cancer*. 15, (Epub ahead of print]

**Article 3: CORRELATION BETWEEN THE P16<sup>INK4a</sup> AND Ki67 EXPRESSION IN NORMAL, DYSPLASTIC AND NEOPLASTIC UTERINE CERVICAL EPITHELIUM AND INFECTION BY HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV).**

Mylius, L.C.M<sup>1,2</sup>., Edelweiss, M.I.A.<sup>1,4</sup>, Meurer, L<sup>4</sup>., Igansi, C.N.<sup>3</sup> & Bozetti, MC<sup>1,3</sup>

1. Post Graduation Program in Medical Sciences, 2.School of Pharmacy, 3.Post Graduation Program in Epidemiology, 4. Hospital of Clinics of Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul.

**Funding Source: Fipe, Hospital of Clinics of Porto Alegre, RS - Brazil**

## ABSTRACT

The Human Papillomavirus (HPV) is the main etiologic factor of the cervical cancer, responsible for about 99,0% of the uterine neoplasias. Cellular cycle proteins like the p16<sup>INK4a</sup> and the Ki67 proliferation nuclear antigen have been used as oncogenicity cellular markers. The oncoproteins E6 and E7 interact with tumor suppressor genes p53 and pRb, culminating with the p16<sup>INK4a</sup> superexpression. The objective of this study was to evaluate the presence of HPV-DNA in 176 cervical biopsies and correlate the different histological grades with the p16<sup>INK4a</sup> and Ki67 immunohistochemical expression (IHC). The presence of the HPV-DNA was observed in 75,0% of the patients tested, among which 38,2% were positive for the high-risk viral types analyzed. In relation to the p16<sup>INK4a</sup>, the expression of 69,5% was found, being expressed in 100,0% of the malignant neoplasias. The Ki67 expression was statistically significant in the association with the lesion grade, being more expressive in the most severe lesions. The p16<sup>INK4A</sup> and Ki67 markers coexpression was present in 86.5% of the samples ( $p < 0.001$ ), where the expression percentage was higher in high-grade lesions and cancer ( $p < 0.001$ ). These results suggest a strong association between the presence of HPV-AR infection and the p16<sup>INK4a</sup> and Ki67 superexpression.

## INTRODUCTION

The cervical cancer is the second cause of malignancy among women worldwide, considered as a cause of morbidity and mortality (Astbury K et al., 2006). The persistent infection by the high-risk (HR) Human Papillomavirus (HPV) represents the main risk factor associated with cervical carcinogenesis, which was observed in up to 99.0% of the cases (Valgareva et al., 2004; Longatto Filho et al., 2005; Tsay et al., 2005).

It is believed that in the general population, more than 40,0% of women are infected by HPV-AR sometime in life, where 25,0% of them develop persistent infections and one third can evolve to high-grade intraepithelial lesion within 5-6 years after initial infection (Hampl et al., 2007).

The cytomorphological criteria for the diagnosis of pre-neoplastic lesions present a wide inter- and intraobserver variability, justifying thus the need to link immunohistochemical markers (IHC) for the diagnosis optimization (Keating et al, 2001).

In the last years, studies have shown that important factors contribute to the malignant transformation process (Castellsagué X et al., 2002; Yokoyama M et al., 2003; Wright JD et al., 2005). In addition to the viral infection, among such factors, we can mention the bigger host susceptibility and the clonal propagation of neoplastic cells (Hampl et al., 2007).

In normal cells, the cyclin-dependent kinase (CDKs) activity, cellular cycle proteins, is regulated by the CDK inhibitors, including the p16<sup>INK4a</sup>, that acts as a tumor suppressor inhibiting the CDK4 and CDK6 that phosphorylize the retinoblastoma protein (pRb). The p16<sup>INK4a</sup> function loss is analogous to the pRb deactivation in cells with DNA-virus-induced immortality, such as HPV, for example (Munro et al., 1999).

The HPV-DNA integration occurs between the E1 and E2 regions of the viral genome, increasing the expression of the E6 and E7 transforming genes (Munger et al., 2004; Queiroz et al., 2006). The E6 oncoprotein interacts with the tumor suppressor gene p53, deactivating it; however, the E7 protein interacts with the retinoblastoma protein (pRb), inducing the release of the E2F transcription factor and stimulates the S-phase cell cycle progression, causing the increase in the cyclin-dependent kinase inhibitor expression levels, p16<sup>INK4a</sup> (Propioleck et al., 2004; Queiroz et al., 2006; Horn et al., 2006). Thus, the p16<sup>INK4a</sup> protein induction is a present factor in the pre-malignant and malignant lesions caused by the uterine cervix HPV and has been considered as a dysplasia marker, superexpressed in such lesions (Kim et al., 1998; Van de Pute et al., 2004; Ekalaksananan et al., 2006, O'Neill et al., 2006).

Several authors have described the p16<sup>INK4a</sup> role in the uterine cervical neoplasias to confirm equivocal cytological results, for its importance linked to the HPV-DNA test, as a diagnostic tool, or in the prognostic analysis of lesions (Rüdger et al., 2002; Van de Putte et al., 2003; Volgareva et al., 2004; Longatto Filho et al., 2005; Jeong et al., 2006; Ekalaksananan et al., 2006; Queiroz et al., 2006; Rocha A et al., 2007).

The p16<sup>INK4a</sup> activity has been studied in other tumor types or even linked to other markers in order to elucidate diagnoses (Keating et al., 2001; Walts et al., 2006; Samama et al., 2006; Horn et al., 2006; Liang, et al., 2007). This protein has also been related to genetic mechanisms like mutation, hypermethylation or loss of heterozygosity, which would be involved in its deactivation (Park et al., 2001; Virmani et al., 2001; Yang et al., 2004; Volgareva et al., 2004).

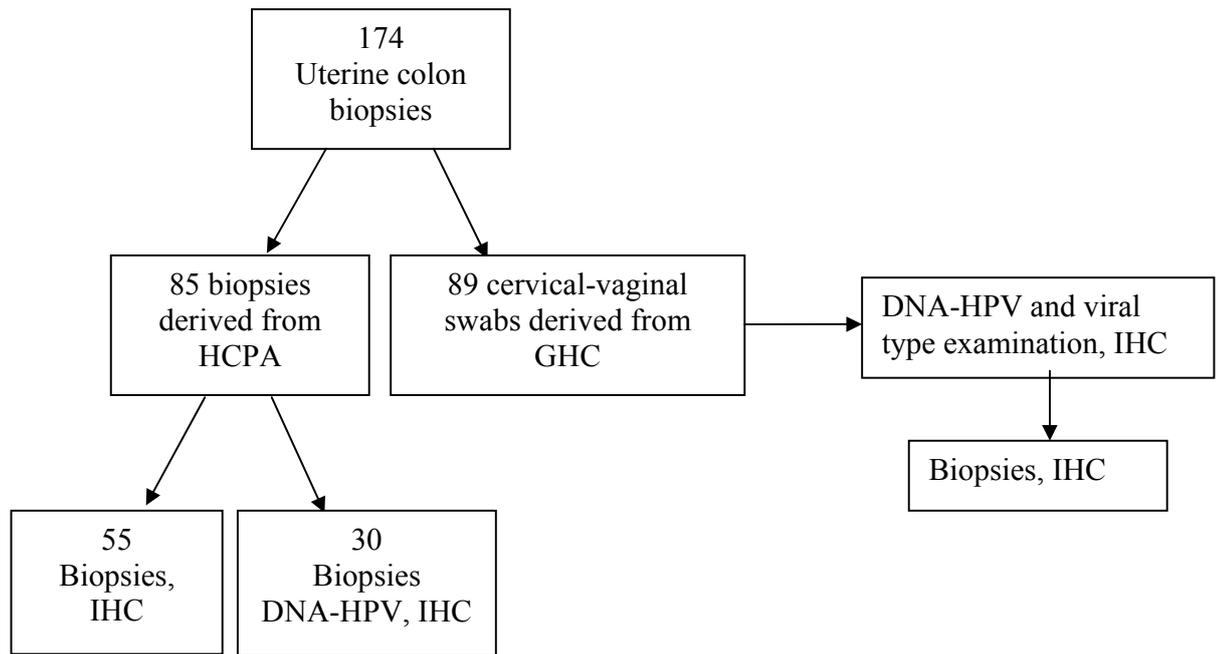
The Ki67 antibody expression has been related by several authors in several types of malignant lesions, like vulva, penis, breast, esophagus and uterine cervix, indicating the presence of mitotic activity (Hong et al., 1995; Fernandes et al., 2002; Koyamatsu et al., 2003; Logani S et

al., 2003; Agoff, et al., 2003; Longatto Filho et al., 2005). Ki67 is a non-histone cell proliferation antigen, present in the cell nucleus, which is expressed in all the cellular cycle phases, except in G0 (Walts et al., 2006). The Ki67 expression in the upper third of the basal layer of the metaplastic epithelium is an event that occurs in active lesions and is a strong predictor of proliferation and progression, increasing its expression in parallel with the lesion aggressiveness (Longatto Filho et al., 2005).

With the purpose to verify the expression of the markers p16<sup>INK4a</sup> and Ki67 in different cervical lesion grades, biopsies of uterine cervix of patients attended in two Public Hospitals of Porto Alegre, South region of Brazil were analyzed: Hospital of Clinics of Porto Alegre (HCPA) and Grupo Hospitalar Conceição – GHC [Conceição Hospital Group – GHC].

### **Material and Methods**

This is a cross-sectional study that involved a total of 174 women that were submitted to uterine cervix biopsy between February 2003 and December 2006. A flowchart of the origin of such samples is presented in the figure 1. All of them presented the histopathological diagnosis performed at the origin center.



**Fig. 1: Flowchart of acquisition of this study's samples**

### *Samples*

In the sample of women derived from GHC (89), the Polymerase Chain Reaction (PCR) test was performed in order to identify the presence or absence of HPV-DNA in the material collected from the uterine cervix, and subsequently stored at -20 °C until the DNA extraction. The positive HPV-DNA samples were typed for the most prevalent HR-HPV (HPV-16, -18 and -31).

In the HCPA sample (85), 30 women were analyzed only for the presence of HPV-DNA through the PCR and IHC techniques and 55 only through the IHC technique.

### ***HPV-DNA Extraction***

The extraction of DNA from the cervical-vaginal swab samples of the 89 patients of GHC and 30 of HCPA was carried out according to the Proteinase K protocol (Sambrook J. et al., 1999).

The technique was directed to the L1 gene and the *primers* used were My09 and My11. The PCR conditions were described by Bauer *et al* (1993) and Coutlée *et al* (2002). For the PCR reaction internal control,  $\beta$ -globin *primers* were developed and tested in all the samples (Bauer and Manos, 1993).

### ***Research of the most frequent oncogenic types***

All the positive samples in the HPV-DNA screening of the 89 patients of GHC were typed for AR (HPV-16, -18 and -31), using specific *primers* corresponding to the regions E6 and E7 of the viral genome. The amplification conditions and the *primers* used are based on the methodology described by Cuzick *et al* (1994) (Table 1):

**Table 1: Primers and Amplification Conditions by PCR**

<b>Viral Type</b>	<b>Sequence</b>	<b>Ta<sup>a</sup> (°C)</b>
<b>HPV-16</b>	5'...GC GAT CCT GTC TGC TTT TAT ACT AA...3' (sense)	54°C
	5'...AAG GCC AAC TAA ATG TCA C...3' (antisense)	
<b>HPV-18</b>	5'...TGC AGC ACG AAT GGC ACTGGC CTG...3' (sense)	70°C
	5'...CAC GGC GAC CCT ACA AGC TAC CTG...3' (antisense)	
<b>HPV-31</b>	31A 5'...TACCTGTGTTTCTGTAAAC...3' (sense)	52°C
	31S 5'...AGAAAGACCTCGGAAATTG...3' (antissense)	

In order to control the reactions functioning, a reaction positive control was tested for each DNA PCR of clinical samples, which consisted in a 450pb fragment corresponding to the Caski and Siha cells (cells infected with the HPV virus), and a reaction negative control with the omission of any DNA. In all the tested samples, *primers* complementing the human  $\beta$ -globin gene (gH20 and PC04) were used as a reaction internal control (Bauer HM et al.,1993).

### ***Biopsies***

After the selection of the biopsy paraffin blocks, new plates were prepared and stained through the hematoxylin-eosin technique for the histological revision, which was revised by a trained pathologist doctor (MIE) (Jalava P et al., 2006).

### ***Immunohistochemistry (IHC)***

The 174 cervical biopsies fixed in formalin, embedded in paraffin were cut out (4 micrometers thick) and deparaffinized in xylem, followed by rehydration. For the antigen retrieval, the plates were heated in citrate buffer pH 6,0 in a microwave oven for 20 minutes. The cuttings were left at room temperature and washed with phosphate buffer three times for 5 minutes each. After the endogenous peroxidase block, the cuttings were rehydrated and the plates were submitted to the immunohistochemical process (Mills B, 1992; Santos RTM et al, 1999).

In order to determine the P16<sup>INK4A</sup> expression, the p16<sup>INK4A</sup> antibody was used (Neomarkers Ab-7, 16P07 clone, cat#AP-9003, California, USA) using the technique described above. The cytoplasmatic and nuclear colors were evaluated and considered as positive for the p16<sup>INK4a</sup> expression. The expression intensity was graduated according to Bulten et al. (2006) that considered as negative (-) if none of the cells expressed coloring, positive (+) if the percentage of expressing cells ranged between 1-25.0%, positive (++) if the percentage ranged between 26-75,0% and positive (+++) if over 75,0% of the cells were stained. The expression standard was

also evaluated and considered as focal if the expression was concentrated in some areas, and diffuse, if the expression was distributed throughout the plate.

The antibody Ki67, MIB-1 clone (DAKO, Glostrup, Denmark), was incubated for 12 hours, at 4 °C, at the dilution of 1:200, followed by the application of the streptavidine-biotine-peroxidase complex (LSAB, Dako), counterstained with diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB Kit, Dako) and contrasted with hematoxylin. The reaction presented as a positive control for Ki67 a cutting containing reactive hyperplasic lymphonode, where the negative control was performed in the same type of sample without the primary antibody. The Ki67 positive expression was considered as the nuclear color above 5.0% of the basal layer cells.

### ***Study's Variables***

The study's conclusions were the histopathological diagnosis of the uterine cervix lesions, the HPV-DNA and HPV-DNA-HR type examination (HPV-16, -18 and -31). The results of the histopathological examination were categorized into normal, low-grade lesion (LSIL), high-grade lesion (HSIL) and invasive cancer. The LSIL category included the results with grade 1 cervical intraepithelial neoplasia (CIN I) diagnosis and the HSIL category, the findings with grade 2 and 3 cervical intraepithelial neoplasia (CIN II, III) and invasive cancer diagnosis (Wright.TC et al., 2002) The HPV-DNA results were classified into two categories: presence of absence of HPV and/or HPV-AR. The P16<sup>INK4a</sup> and Ki67 expressions were related to such conclusions.

### ***Data Quality Control***

All the information was stored in a double-typing database. A total of 20,0% of the questionnaires were selected at random and checked against the original ones to verify possible errors and divergences.

### ***Statistic Analysis***

In order to compare the categorical variables, the Chi-square test or Fisher's Exact test was used, when recommended. The continuous variables were analyzed through the Student's T test and ANOVA. The findings with p value  $\leq 0,05$  were considered as statistically significant. For data analysis, the SPSS program version 13.0 was used.

### **Results**

The women studied aged in average  $38,5 \pm 13,2$  years old. When stratifying it according to the lesion histological grade, it was verified that the average age of the women with unaltered anatomopathological examination was  $45,6 \pm 14,7$  years old, in those with low-grade lesion, the average age was  $34 \pm 12,5$  years old. However, in women with high-grade lesion, the average age was  $28,2 \pm 11,7$  years old and in cancer-carrying women, the average was  $41 \pm 7,2$  years old.

### ***HPV-DNA Analysis***

Among the total patients, 68,4% (119/174) had a result for the HPV-DNA research, where 87,4% (104/119) were positive. In 75,0% (89/119) of the patients submitted to the HPV-DNA examination, the HPV-DNA-HR type examination was performed, where 38,2% (34/89) were positive. There was a statistically significant association between the presence of HPV-DNA ( $p=0,01$ ) and HPV-DNA-HR ( $p<0,001$ ) and the histological lesion grade (Table 2).

**Table 2. Distribution of the anatomopathological diagnosis frequency according to the presence of HPV-DNA and/or HPV-DNA-HR.**

<b>Anatomopathological</b>	<b>N</b>	<b>HPV-DNA +</b>	<b><i>p</i>*</b>	<b>HPV-DNA HR (%)</b>	<b><i>p</i>*</b>
Normal	62	24 (38,7%)		08 (33,3%)	
Low grade	78	72 (92,3%)	0.01	22 (28,2%)	<0,001
High Grade	08	08 (100,0%)		04 (50,0%)	
Cancer	26	ND		ND	
Total	174	104		34	

**ND - not done; HPV-DNA-HR – high-risk HPV DNA;**

**\* *p* value–  $\chi^2$  test for HPV-DNA and/or HPV-DNA-HR versus anatomopathological diagnosis**

**N= no. of patients; HPV-DNA: presence of HPV-DNA**

### ***p16<sup>INK4a</sup> Expression***

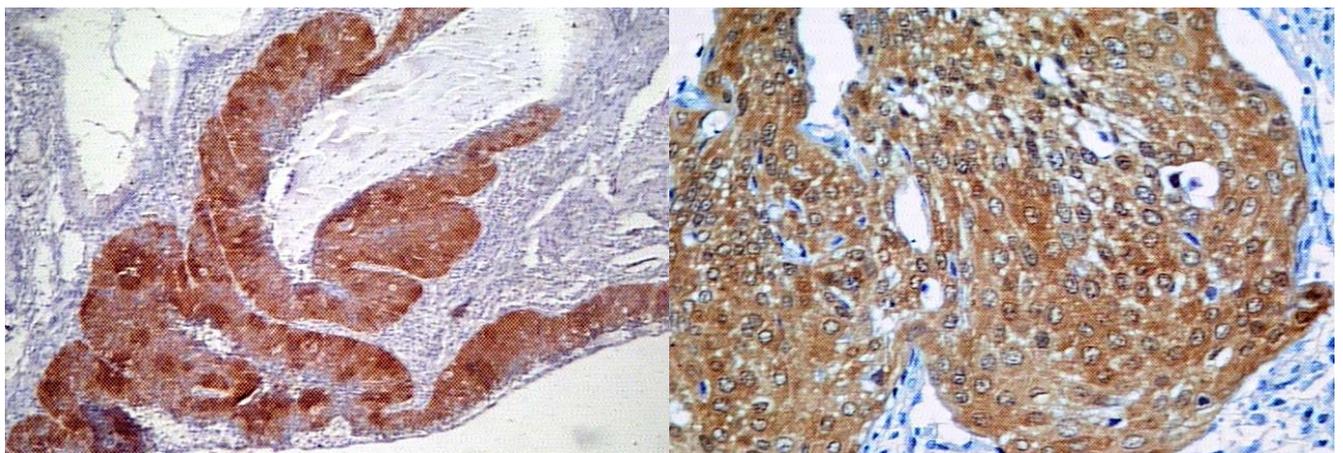
Considering the 174 biopsies evaluated for the p16<sup>INK4a</sup> expression regardless of the anatomopathological diagnosis, it was verified that it was expressed in 69,5% (121/174), and among them, 83.5% (101/121) presented a diffuse standard and 16.5% (20/121), a focal standard.

Among the HPV-DNA-positive women (104/119), 79.8% (83/104) expressed p16<sup>INK4a</sup> in the nucleus and/or cytoplasm and this association was statistically significant ( $p=0,009$ ; OR=4,52; CI95%: 1,47-13,87). Among women with positive diagnosis of HPV-DNA-HR, 85,7% (29/34) expressed p16<sup>INK4a</sup>, where the expression intensity ranged between moderate to strong in 52,0% ( $p=0,01$ ; OR=2,98; CI95%:1,31-6,82) and diffuse standard in 62,0% of the cases ( $p=0,47$ ; OR=1,65; CI95%: 0,60-4,56). Regarding the presence of HPV-16, it was noted a statistically

significant association ( $p=0,007$ ) with the p16<sup>INK4a</sup> expression, which was expressed in 100.0% of the cases (16/16).

The Table 3 describes the association between the anatomopathological diagnosis and the p16<sup>INK4a</sup> expression. There was a bigger expression of this protein in high-grade lesions and this association was statistically significant ( $p<0,001$ ). The same was observed in relation to the p16<sup>INK4a</sup> expression intensity between moderate to strong ( $p<0,001$ ) and in relation to the diffuse standard ( $p<0,001$ ).

The p16<sup>INK4a</sup> expression in relation to the presence of HPV-DNA was analyzed according to its intensity and to the expression standard. The intensity ranged between moderate to strong in 59,0% of the HPV-DNA-positive biopsies and, in 13,0% of the negative ones ( $p=0,004$ ). Regarding the standard, it was diffuse in 66,0% of the HPV-positive samples and in 33,0% of the negative ones. For the high-risk viral types, this association was also statistically significant ( $p<0,001$ ; OR=7,02; CI95%: 2,48-19,90). The figure 1 illustrates the p16<sup>INK4a</sup> immunohistochemical expression.



**Fig 1. Strong and diffuse p16<sup>INK4a</sup> expression in case of high-grade lesion (A=100x, B=400x)**

**Table 3. p16<sup>INK4a</sup> expression according to the anatomopathological diagnosis**

Variables	<i>Anatomopathological Diagnosis</i>					<i>p</i> *
	Normal (62) N (%)	Low Grade (78) N (%)	High Grade (8) N (%)	Cancer (26) N (%)	Total N	
<i>p16<sup>INK4a</sup> Expression</i>	26 (41,9)	62 (79,5)	7 (87,5)	26 (100)	121	<0,001
<i>Expression Intensity between Moderate to Strong (%)</i>	14 (22,6)	43 (55,1)	7 (87,5)	25 (96,2)		
<i>Expression Standard</i>						
Diffuse	17 (65,4)	51 (82,3)	6 (87,5)	26 (100)		
Focal	9 (34,6)	11 (17,7)	1 (12,5)	0 (0)		

\* p value -  $\chi^2$  Test

#### ***Ki67 Expression***

Among the HPV-DNA-positive samples 87,4% (104/119), 41,3% (43/104) expressed the Ki67 marker ( $p=0.78$ ; OR=1,41, CI95%: 0,45-4,42). The Ki67 expression was observed in 47,0% (16/34) of the high-risk HPV-positive samples ( $p=0,19$ ; OR= 1,99, CI95%: 0,82-4,81).

The Table 4 describes the Ki67 expression in relation to the anatomopathological diagnosis and this association was statistically significant ( $p<0,001$ ).

**Table 4. Ki67 expression according to the anatomopathological diagnosis in 74 biopsies**

Variables	Anatomopathological Diagnosis				Total	p*
	Normal (62) N (%)	Low Grade (78) N (%)	High Grade (8) N (%)	Cancer (26) N (%)		
<b>Ki67 Expression</b>	19 (31,0)	28 (35,9)	8 (100,0)	19 (73,0)	74	<0,00 1

\* p value -  $\chi^2$  Test

***p16<sup>INK4a</sup> and the Ki67 antigen coexpression***

The coexpression of the p16<sup>INK4A</sup> and Ki67 markers was observed in 86,5% (64/74) of the samples ( $p < 0,001$ ; OR= 4,83; CI95%: 2,24-10,48) (Table 5).

**Table 5. Coexpression of p16<sup>INK4a</sup> and the Ki67 antigen in 74 biopsies**

Variables	p16 <sup>INK4a</sup> Expression		P*
	Positive N (%)	Negative N (%)	
<b>Ki67 Expression</b>			<0,00 1
Positive	64 (86,5)	10 (13,5)	
Negative	57 (57,0)	43 (43,0)	

\* It was considered as positive when there were 5 or + cells with positive nuclei for Ki67.

The table 6 describes the percentage of cells that expressed both markers, observing the relation between the amount of cells that expressed Ki67 and p16<sup>INK4a</sup>, and, it was found that as the p16<sup>INK4a</sup> expression increased, so did the percentage of cells expressing Ki67. The table 7

presents both markers expression relation, considering the histological grade. This table shows that both markers expression percentage was higher in the high-grade lesions and cancer ( $p < 0,001$ ).

**Table 6. Description of the percentage of cells that expressed the markers or not**

Variables	p16 <sup>INK4a</sup> Expression Amount of Expressing Cells				P*
	No Expression N (%)	≥ 1 to ≤ 10 N (%)	> 10 to ≤ 50 N (%)	> 50 N (%)	
<b><i>Ki67 Expression</i></b>					<0,00 1
Positive	10 (13,5)	1 (1,3)	7 (9,5)	56 (75,7)	
Negative	43 (43,0)	3 (3,0)	16 (16,0)	38 (38,0)	

\*  $p$  value -  $\chi^2$  Test

**Table 7. Distribution of the frequency of p16<sup>INK4a</sup> and Ki67 coexpression according to the lesion's histological grade**

Variables	Anatomopathological Evaluation				P*
	Normal (62) N (%)	Low Grade (78) N (%)	High Grade (8) N (%)	Cancer (26) N (%)	
<b><i>p16<sup>INK4a</sup> and Ki67 coexpression</i></b>	13 (21,0)	25 (32,0)	7 (87,5)	19 (73,0)	<0,00 1

\*  $p$  value -  $\chi^2$  Test

## **Discussion**

The study of different carcinogenesis stages in a model that includes early stages of the cancer development has important clinical implications. In the uterine cervical cancer, the early alterations not always precede those of the highly evolved cancer. This fact has taken several researchers to monitor such lesions evolution through periodic follow ups by cytology, colposcopy and biopsy (Kinney et al., 1998; Manos et al., 1999; Nieh S et al., 2003; Tu SP et al., 2005). Although the HPV infection can take to invasive lesions within a general context, this fact can be prevented by the judicious histopathological study of pre-neoplastic lesions. It is extremely important to seek more objective parameters that are associated with early lesions and that can reflect the progression to malignancy. This study aimed at verifying the p16<sup>INK4A</sup> and Ki67 expression in different histological grades of cervical lesions and associating it to the presence of HPV-DNA and HPV-DNA-HR. The presence of the virus, as well as its association with cervical lesions has been the subject of study for several researchers (Keating et al., 2001; Klaes et al., 2002; Park et al., 2003; Longatto Filho et al., 2005; Schlecht et al., 2006; Oliveira et al., 2006; Hampf et al., 2007). Although this fact is relevant and well documented, in some cases, the HPV-DNA cannot be evidenced or, even in the presence of the virus, some patients presented diverse prognosis standards, with a big variation in time and the disease extension. With the purpose to elucidate such variations, other risk factors and some molecular markers have been studied in the last decades (Meekin et al., 1992; Ho et al., 1994; Kristiansen et al. 1994).

The epidemiological profile of the patients included in this study shows an average age of 34 years old for the patients carrying a low-grade lesion, 28 years old for those with high-grade lesion and 41 years old for those with cancer diagnosis. This finding differs from what was described by Misra et al (2006) e Yoshida et al. (2007) that suggest a relatively slow progression

of cervical lesions, where the most serious lesions were observed at the latest ages. This was not observed in a study carried out by Ishikawa et al. (2006), who verified the prevalence of high-grade lesions in women aged between 30-39 years old. An explanation for such findings could be the age distribution of the population studied, which includes a larger amount of young women, as well as the sexual behavior standard, suggesting a bigger exposure for them and, consequently, a higher risk of this type of lesion in such patients.

The low-grade lesion progression, usually more common with HR-HPV-DNA, occurs along with the viral integration to the host cell. In this study, it was curiously observed that in low-grade lesions, there is a prevalence of HR-HPV-DNA. This finding emphasizes the importance of following up these patients, provided that such lesions are more likely to evolve to high-risk lesions as time goes by. This fact corroborates the results described by other authors (Kim et al., 1998; Alexandrova et al., 1999; Chan et al., 2002; Isaka et al., 2004; Herrero et al., 2005; Sichero L, 2007). These authors suggest that the presence of the HR virus is closely associated with the uterine cervical cancer precursor lesions. Moreover, the high-risk viral types studied (HPV-16, -18 and -31) have also been described by other authors as associated with potentially active intraepithelial lesions (Ishikawa et al., 2006; Queiroz et al., 2006, Samama et al., 2006).

In this study, the HPV-16 was found in 23,9% and the HPV-31 was the second most detected type. According to some researchers, such viral types are related to more serious lesions and also to a more intense p16<sup>INK4a</sup> expression (Alexandrova et al., 1999; Chan et al., 2002; Juneja et al., 2003; Ishikawa et al., 2006; Hampl et al., 2007).

The P16<sup>INK4a</sup> is a protein encoded by the CDKN2A gene, situated in the 9p21 chromosome that also encodes the p14<sup>ARF</sup>, a tumor-suppressing protein, which exerts its effect in the p53 route (Kanao et al., 2004; Kong et al., 2006, Astbury et al., 2006). The p16<sup>INK4a</sup> acts as a

tumor-suppressing protein, blocks cell-cycle progression by binding cyclin-dependent kinase 4 and 6 and inhibiting cyclin D. By inhibiting phosphorylation of Rb, p16<sup>INK4a</sup> promotes the formation of an Rb-E2F repressive transcription complex, which also blocks cell-cycle progression at G1-S restriction point. In such case, when the viral oncoproteins integrate the cell, they make the viral genome unstable causing the E2 loss, an increased E6 and E7 expression, unbalancing the cellular cycle (Kanao et al., 2004; Motoyama et al., 2004, Yoshida et al., 2007). Thus, the activity of the tumor-suppressing genes p53 and pRb, depleted by the oncoproteins E6 and E7, respectively, through a positive feedback effect, contributes to a bigger expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor protein, p16<sup>INK4a</sup> and its expression has been used for its high sensitivity and specificity to detect active lesions caused by HR-HPV. In such cases, it was verified a smaller vigilance at the cellular cycle's "checkup points", both at G1 and in the M phase. The immunohistochemical expression and its accumulation in the uterine cervix epithelial cells can be expressed in the cytoplasm or in the nucleus. This fact occurs in a diverse manner in tumors of other organs where the protein sometimes is deactivated and the IHC study can show even a negative test (Motoyama et al., 2004, Yoshida et al., 2007).

The p16<sup>INK4a</sup> expression was present in 69,5% of the biopsies, especially in HPV-positive patients (104/119). Our results show a high prevalence of p16<sup>INK4a</sup> expression among the HPV-DNA-positive women; 79,8% (83/104) expressed this marker in the nucleus and/or in the cytoplasm and such association was statistically significant ( $p=0,009$ , OR= 4,52; CI95%: 1,47-13,87). However, among the women with positive diagnosis of HPV-DNA-HR, 85,7% (29/34) expressed p16<sup>INK4a</sup>, where the expression intensity ranged between moderate to strong in 52,0% ( $p=0.01$ , OR 2,98; CI95%:1,31-6,82), also a statistically significant fact. In relation to the presence of HPV-16, the type most often studied in the cervical carcinogenesis, it was found a

statistically significant association ( $p=0,007$ ) with the p16<sup>INK4a</sup> expression, where it was expressed in 100,0% of the cases (16/16).

These findings are in conformity to other studies, which showed that the presence of HPV-AR is strongly associated with the pRb deactivation and p16<sup>INK4a</sup> expression and, consequently, associated with the presence of the subtype 16, which is the most commonly researched in our environment (Kruse et al., 2004; Tsai et al., 2005; Samama et al., 2006).

Regarding the p16<sup>INK4a</sup> protein expression, in relation to the anatomopathological diagnosis, it was found a bigger expression and intensity, as well as the diffuse standard in the high-grade lesions and cancer. Comparing the types of histopathological diagnosis and the p16<sup>INK4a</sup> expression, all values showed a statistical relevance, according to Table 2. In most of the samples used in our study, the expression standard was diffuse (83,5%) while only 16,5% was focal. These frequent alterations can represent a higher risk of cancer development to the women involved in this study and the Brazilian women in general, where about 30,0% of the patients may evolve to cervical cancer (Cavalcanti SMB et al., 1996). This result is in accordance with what was described by other researchers (Ekalaksananan al., 2006; Lambert et al., 2006). Considering that the PCR examinations are more complex, many researchers use the IHC as a tracking test and the nuclear and/or cytoplasmatic color in the biopsy can be considered as a surrogate marker for genetic alterations, even without the HPV-DNA corroborative tests. However, the IHC technique can sometimes be falsely positive without genetic alterations, due to the presence of unstable, expired antibodies, with incomplete antigen retrieval, non-specific bonds with the host proteins or with viral proteins (Greenblat MS et al., 1994). This fact shows the care that the laboratory must have during the technical execution of those examinations. Thus, few cases can represent false-positive results, although most of times the p16<sup>INK4a</sup> expression is

quite sensitive and specific in lesions. Also in other situations using monoclonal antibodies, some conditions may take to false-negative results, just like when an epitope that could be recognized by the antibody is inaccessible by bonds with other non-specific proteins, resulting in a negative color. Such events can be prevented with the use of control plates, undoubtedly positive, processed along with the group of plates tested (Greenblat MS et al., 1994). This procedure was performed in our study excluding those possibilities and there were no negative cases for p16<sup>INK4a</sup> with the presence of histological lesion.

There was a p16<sup>INK4a</sup> expression in a percentage of samples with normal histology. This fact may suggest the presence of HPV infection, especially other types of high-risk HPV not tested in this research, at the early alterations in the cellular cycle. As suggested by Lambert et al. (2006), the protein expression can also occur in the absence of viral infection, pRb deactivation and by a HPV-independent mechanism. However, the absence of anatomopathological alterations may occur by virtue of diagnostic difficulties, the presence of slight alterations that occur at the early process, when the detection is still difficult to be performed or can not be visualized through colposcopy, cytology and/or biopsy with an unsuitable material. Although the p16<sup>INK4a</sup> expression and the presence of HPV-DNA are associated with low-grade lesions or in reactive alterations, subject to spontaneous regression, Negri G et al. (2004) verified an increased probability of low-grade lesion progression or viral persistence in women with p16<sup>INK4a</sup> diffuse standard. This study's findings also suggest a prevalence of this standard in lesions, what would justify the follow up of those women, provided that they have a potentially high risk to evolve to more serious lesions (Ekalaksananam et al., 2006).

The Ki67 nuclear antigen expression is present in the cellular cycle's proliferating cells and absent at the G0 phase (rest). Its presence has been studied in a number of types of neoplasia

including colon-rectum, bladder and breasts, where it is used as a cell proliferation index substituting the exhaustive mitosis-counting method. Here, the Ki67 expression was studied with the MIB-1 monoclonal antibody, which detects the mitotic cells in paraffin-embedded sections, with the purpose to evaluate if more serious lesions could have a higher proliferation rate and then suggest a potential evolvement to invasive neoplasia. We found 74 cases (42,5%) with Ki67 expression among the 174 cases studied. In the evaluation through histopathological diagnosis, this positivity showed to be more relevant in high-grade lesions (100,0%) and in the invasive carcinoma (73,0%), and the correlations were statistically significant, as shown on Table 3.

The Ki67 cell proliferation antigen has been mentioned in some studies as having its expression increased in proliferative lesions, which is recommended as a prognostic marker in tumors (Keating et al., 2001; Carrilho et al., 2003; Sarian et al., 2006; Queiroz C et al., 2006). The immunopositivity for Ki67 reflects an action among the proliferative activity, the cervical-intraepithelial neoplasia grade (CIN) and the presence of HPV-DNA. This antigen has a practical applicability in the identification of lesions adjacent to CIN, separating them from benign lesions, like atrophic squamous epithelium, immature squamous metaplasia or transition epithelium, in which there is a low expression. This protein also seems to be important in the distinction of cauterized margins of CIN 3 from the non-dysplastic ones and this quantitative analyses has a good reproducibility and could be used as a diagnostic support method for grading, especially in research setting (Kruse, 2003; Mc Cluggage, 2006). The nuclear positivity of Ki67 in the upper third of the epithelium is a strong marker of high-grade lesion; however, for low-grade lesions, the variability in this marker's expression, both in the number of cells and the expression intensity is a cause of misinterpretation (Keating et al, 2001). The histological alteration prevalent in the Keating et al's study (2001) was the LSIL (low-grade lesion), usually associated with HPV

infection. In 2005, Baak et al presented a high predictive positive value of this marker for low-grade lesions that may evolve. This fact could reduce the health service costs, avoiding unnecessary treatments in such lesions.

Among the HPV-DNA-positive samples (104/119) of our study, 36.1% (43/104) expressed the Ki67 marker ( $p=0,78$ ,  $OR=1,41$ ,  $CI95\%: 0,45-4,42$ ). The Ki67 expression was observed in 47% of the HPV-DNA-HR-positive samples ( $p=0,19$ ,  $OR= 1,99$ ,  $CI95\%: 0,82-4,81$ ). Such findings were not statistically relevant.

The Ki67 expression was bigger in high-grade lesions; however, in patients identified as normal, most of them HPV-DNA carriers, this marker was also expressed. As justified by Sarian et al (2006), the inflammatory lesions related to the pathogenesis of low-grade lesions and CIN can explain a bigger Ki67 expression in the morphologically unchanged and non-proliferative epithelium. An important factor was that in this study, the cut point for positivity was of 5,0% of stained cells, while in other studies, this value may be higher, what could alter our final results, causing a larger number of negative cases. Such differences can be observed on Table 6, in which we stratified the positivity levels in percentage of stained cells. The possibility of false positive and negative results with this staining must also be carefully analyzed with the proper use of positive and negative internal controls associated with the identification of typical or atypical mitosis stained through the Hematoxylin-Eosin (H&E) method.

Linking the analysis of this marker to other markers already known such as p53, bcl-2 has been studied as prognostic markers, what could improve the diagnostic accuracy in cervical pathology. In this study, it was verified an association between the proteins Ki67 and p16<sup>INK4a</sup> and the histological lesion's grade in 64 of 174 (36.8%), provided that the most serious lesions also presented a bigger expression for such markers. This finding was statistically significant.

It was found that, as the percentage of cells that express Ki67 increase, this increase also occurs for p16<sup>INK4a</sup>, provided that both indicate cellular activity, proliferation and a potential oncogenicity. This association seems to occur most often in high-grade lesions and cancer.

According to the histological grade, as it can be seen on Table 7 with the distribution of the frequency of p16<sup>INK4a</sup> and Ki67 coexpression according to the lesions' histological grade, the p16<sup>INK4a</sup> and Ki67 markers' coexpression suggests that HPV-induced lesions may point the activation of molecules that control the cellular proliferation, like Ki67, the deactivation of suppressing genes like p16<sup>INK4a</sup> and the reduction of cellular apoptosis, mechanisms shown by Nair et al., 1999 through the Bax/bcl-2 inverse relation in more serious histological lesions. Samama, et al showed in 2006 the negativity for p16<sup>INK4a</sup> in low-risk HPV-induced lesions, 6 and 11, justifying it for the absence of the E7 protein's oncogenic activity over pRb.

Regarding the high prevalence rates for HPV infection and p16<sup>INK4a</sup> and Ki67 expression and coexpression, we proposed that such molecular events may contribute to the malignant transformation in cervical carcinogenesis. The presence of HPV-DNA and the consequent oncogenicity mechanisms previously proposed in several studies (epigenetic events, related to hereditary changes in the hypermethylation genetic standard, loss of heterozygosity and others) (Park et al., 1999; Wong et al., 1999; Yang et al 2004; Jeong DH et al., 2006 induce the p16<sup>INK4a</sup> protein expression through the pRB deactivation and the Ki67 expression through the definition of the neoplastic lesion's proliferative activity, resulting from the infection by the high-risk viral types. The epithelial cells that present such molecular alterations accumulated, when infected by HPV, may cause an acceleration of the process of progression to cancer.

Although our study population has been used in uterine cervical biopsies, previously selected by cytological and colposcopic alteration, our study suggests a narrow relation between the presence

of HPV-DNA (mainly the high-risk one) and the bigger p16<sup>INK4a</sup> and Ki67 expression. The already existing epidemiological data corroborate our findings (Agoff et al., 2003; Longato-Filho et al, 2005) and further genetic, molecular and follow up studies can take to a better comprehension of the cervical cancer pathogenesis.

Thus, this study's findings suggest the importance to establish in the routine of tracking of pre-neoplastic cervical lesions the use of molecular markers that can complement doubtful diagnoses avoiding, thus, unnecessary treatments or preventing the handling of lesions that can be potentially inactive.

## References

- Agoff, S.N., Lin, P., Morihara, J., Mao, C., Kiviat, N.B., Koutsky, L.A., 2003. p16<sup>INK4a</sup> Expression correlates with degree of cervical neoplasia: A comparison with Ki-67 expression and detection of High-risk HPV types. *Mod Pathol.* 16 (7), 665-673.
- Alexandrova, Y.N., Lyshchov, A.A., Safronnikova, N.R., Imyanitov, E.N., Hanson, K.P., 1999. Features of HPV infection among the healthy attendants of gynecological practice in St. Petersburg, Russia. *Cancer Letters* 145 (1-2), 45-48.
- Astbury, K., Martin, C.M., Ring, M., Pilkington, L., Bolger, N., Sheils, O.M., O'Leary, J.J., 2006. Future molecular aspects of cervical cytology. *Cur Diagn Pathol* 2, 104-13.
- Baak, J.P., Kruse, A.J., Janssen, E., van Diermen, B., 2005. Predictive testing of early CIN behaviour by molecular biomarkers. *Cell Oncol* 27 (5-6), 277-80.
- Bauer, H.M., Hildesheim, A., Schiffman, M.H., Glass, A.G., Rush, B.B., Scott, D.R., Cadell, D.M., Kurman, R.J., Manos, M.M., 1993. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis.* 20(5), 274-78.
- Bauer, H.M., Manos, M.M., 1993. PCR detection of genital human papillomavirus. In: Persin, D. (Ed.), *Diagnostic Molecular Microbiology*. American Society for Microbiology, pp. 407-413.
- Bulten, J., van der Avoort, I.A.M., Melchers, W.J.G., Massuger, L.F.A.G., Grefte, J.M.M., Hanselaar, A.G.J.M., de Wilde, P.C.M., 2006. p14<sup>ARF</sup> and p16<sup>INK4A</sup>, two products of the same gene, are differently expressed in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol.* 101, 487-494.

- Carrilho, C., Gouveia, P., Cantel, N., Alberto, M., Buane, L., David, L., 2003. Characterization of Human Papillomavirus infection, P53 and Ki67 in cervix cancer of Mozambican Women. *Pahol Res Pract.* 199, 303-11.
- Castellsagué, X.; Bosh, F.X., Muñoz, N., 2002. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* 89, 191-9.
- Cavalcanti, S.M.B., Deus, F.C.C., Zardo, L.G., Frugulhett, .I.C.P.P., Oliveira, L.H.S., 1996. Human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil: a retrospective study. *Mem Unst Osv Cruz* 91(4), 433-440.
- Chan, P.K.S., Chang, AR, Cheung, J.L.K., Chan, D.P.C., Xu, L.Y., Tang, N.L.S., Cheng, A.F., 2002. Determinants of cevical Human Papillomavirus infection: Differences between High- and Low-oncogenic risk types. *J Infect Dis.* 185, 28-35.
- Coutlee, F., Gravitt, P., Kornegay, J., Hankins, C., Richardson, H., Lapointe, N., Voyer, H., Franco, E., 2002. Use of PGMV primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Pathol.* 40(3), 902-7.
- Cuzick, J., Terry, G., Ho, L., Hollingworth, T., Anderson, M., 1994. Type specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 69(1), 167-71.
- Ekalaksananan, T., Pientong, C., Sriamporn, S., Kongyingyoes, B., Pensa, P., Kleebkaow, P., Kritpetcharat, O., Parkin, D.M., 2006. Usefulness of combining testing for p16 protein and human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma screening. *Gynecol Oncol.* 103(1), 62-66.
- Fernandes, M.G.M., Ferreira, F.V.A., Ferreira, S.N.H., Lima, S.M.S., Ilha, F.D.R., Ribeiro, A.V.M., Rabenhorst, S.H., Mesquita, S.M., Ferreira, G., Amorin, L.H.M., 2002. MIB-1 and

- p53 in penile intraepithelial and invasive squamous HPV- related lesions. *Rev Bras de Cancerologia* 48(1), 20-37.
- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., Harris, C.C., 1994. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Review. *Cancer Res.* 54(18), 4855-78.
- HAMPL, M., Wentzensen, N., Vinokurova, S., von Knebel-Doeberitz, M.; Poremba, C., Bender, H., Kueppers, V., 2007. Comprehensive analysis of 130 multicentric intraepithelial female lower genital tract lesions by HPV typing and p16 expression profile. *J Cancer Res Clin Oncol.* 133, 235-245.
- Herrero, R., Castle, P.E., Schiffman, M., Bratti, M.C., Hildesheim, A., Morales, J., Alfaro, M., Scherman, M.E., Wacholder, S., Chen, S., Rodriguez, A.C., Burk, R.D., 2005. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J of Infect Dis.* 191, 1796-807.
- Ho, G.Y., Burk, R.D., Fleming, I., Klein, R.S., 1994. Risk of genital human papillomavirus infection in women with human immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *Int J Cancer* 56(6), 788-92.
- Hong, M.K., Laski, W.B., Herman, B.E., Johnston, M.H., Vargo, J.J., Steinberg, S.M., Allegra, C.J., Johnston, P.G., 1995. Expansion of Ki-67 Proliferative compartment correlates with degree of dysplasia in Barrett's Esophagus. *Cancer.* 75(2), 423-429.
- Horn, L.C., Lindner, K., Szpankiewicz, G., Edelmann, J., Hentschel, B., Tannapfel, A., Bilek, K., Liebert, U.G., Richter, C.E., Einkenkel, J., Leo, C., 2006. p16, p14, p53 and Ciclin D1 Expression and HPV analysis in small cell carcinomas of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol.* 25, 182-186.

- Isaka, K., Nishi, H., Osakabe, Y., Miyata, M., Hokamura, M., Nakada, T., Itokasu, O., Takayama, M., 2004. Establishment of a HPV and p53-mutation-negative human cell line (CA) derived from a squamous carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 92, 15-21.
- Ishikawa, M., Fujii, T., Saito, M., Nindl, I., Ono, A., Kubushiro, K., Tsukasaki, K., Mukai, M., Nozawa, S., 2006. Overexpression of p16<sup>INK4a</sup> as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 16, 347-353.
- Jalava, P., Kuopio, T., Juntti-Patinen, L., Kotkansalo, T., Kronkviat, P. Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index. *Histopathology* 48,674-682.
- Jeong, D.H., Youm, M.Y., Kim, Y.N., Lee, K.B., Sung, M.S., Yoon, H.K., Kim, K.T., 2006. Promoter methylation of p16, DAPK, CDH1, and TIMP-3 genes in cervical cancer: correlation with clinicopathologic characteristics. *Int J Gynecol Cancer* 16, 1234-1240.
- Juneja, A., Sehgal, A., Mitra, A.B., Pandey, A.A., 2003. Survey on a risk factors Associated with cervical Cancer. *Indian J of Cancer* 40, 15-22.
- Kanao, H., Enomoto, T., Ueda, Y., Fujita, M., Nakashima, R., Ueno, Y., Miyatake, T., Yoshizaki, T., Buzard, G.S., Kimura, T., Yoshino, K., Murata, Y., 2004. Correlation between p14<sup>ARF</sup>/p16<sup>INK4A</sup> expression and HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Letters* 213, 31-37.
- Keating, J.T., Ince, T., Crum, C.P., 2001. Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis. *Adv Anat Pathol.* 8, 83-92.
- Kim, J.W., Choo, N.H., Park, S.W., Kim, J.W., 1998. Underexpression of Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* 71, 38-45.

- Kinney, W.K., Manos, M.M., Hurley, L.B., Ransley, J.E., 1998. Where's the High-Grade Cervical Neoplasia? The importance of minimally abnormal Papanicolaou diagnosis. *Obstet Gynecol.* 91, 973-6.
- Klaes, R., Axel, B., Tibor, F., Rüdiger, R., Simon, H., David, K., Dietmar, S., Mark, S., von Knebel Doeberitz, M., 2002. p16<sup>INK4a</sup> immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 26(11), 1389-1399.
- Kong, C.S., Balzer, B.L., Troxell, M.L., Patterson, B.K., Longacre, T.A., 2006. p16<sup>INK4A</sup> immunohistochemistry is superior to HPV in situ hybridization for the detection of high-risk HPV in atypical squamous metaplasia. *Am J Surg Pathol.* 31(1), 33-43.
- Koyamatsu, Y., Yokoyama, M., Nakao, Y., Fukuda, K., Saito, T., Matsukuma, K., Iwasaka, T., 2003. A comparative analysis of human papillomavirus types 16 and 18 and expressing of p53 gene and Ki-67 in cervical, vaginal, and vulvar carcinomas. *Gynecol Oncol* 90, 547-551.
- Kristiansen, E., Jenkins, A., Kristensen, G., Ask, E., Kaern, J., Abeler, V., Lindqvist, B.H., Tropé, C., Kristiansen, B.E., 1994. Human papillomavirus infection in Norwegian women with cervical cancer. *APMIS* 102 (2), 122-8.
- Kruse, A.J., Baak, J.P., Helliesen, T., Kjellevoid, K.H., Robboy, S.J., 2003. Prognostic value and reproducibility of koilocytosis in cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol.* 33(3), 236-9.
- Kruse, A.J., Skaland, I., Janssen, E., Buhr-Wildhagen, S., Klos, J., Arends, M.J., Baak, J.P., 2004. Quantitative Molecular parameters to identify low-risk and high-risk early CIN lesions: Role of markers of proliferative activity and differentiation and Rb availability. *Int J Gynecol Pathol.* 23, 100-109.

- Lambert, A.P., Anshau, F., Schmitt, V.M., 2006. p16<sup>INK4A</sup> expression in cervical premalignant and malignant lesions. *Experimental and Molecular Pathol.* 80, 192-196.
- Liang, J., Mittal, K.R., Wei, J.J., Yee, H., Chiriboga, L., Shukla, P., 2006. Utility of p16<sup>INK4a</sup>, CEA, Ki67, P53 and ER/PR in the differential diagnosis of benign, premalignant, and malignant glandular lesions of the uterine cervix and their relationship with Silversberg Scoring System for endocervical glandular lesions. *Int J Gynecol Pathol.* 26, 71-75.
- Logani, S., Lu, D., Quint, W.G.V., Ellenson, L.H., Pirog, E.C., 2003. Low-grade vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia: correlation of histologic features with human papillomavirus DNA detection and MIB-1 immunostaining. *Modern Pathol.* 16(8), 735-41.
- Longatto Filho, A., Utagawa, M.L., Shirata, N.K., Pereira, S.M.M., Namiyama, G.M., Kanamura, C.T., Santos, G da C, de Oliveira, M.A, Wakamatsu, A., Nonogaki, S., Roteli-Martins, C., di Loreto, C., de Castro Ferraz, M.G.M., Maeda, M.Y.S., Alves, V.A., Syrjänen, K. , 2005. Immunocytochemical expression of p16<sup>INK4A</sup> and Ki-67 in cytologically negative and equivocal pap smears positive for oncogenic human papillomavirus. *Int J Gynecol Pathol.* 24 (2), 118-124.
- Manos, M.M., Kinney, W.K., Hurley, L.B., Sherman, M.E., Shieh-Ngai, J., Kurman, R.J., Ransley, J.E., Fetterman, B.J., Hartinger, J.S., McIntosh, K.M., Pawlick, G.F., Hiatt, R.A.. Identifying women with cervical neoplasia: using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results. 1999. *JAMA* 281, 1605-10.
- Mc Cluggage, W.G. 2006. Immunohistochemical and functional biomarkers of value in female genital tract. *Int J Gynecol Pathol.* 25, 101-20
- Meekin, G.E., Sparrow, M.J., Fenwicke, R.J., Tobias, M., 1992. Prevalence of genital human papillomavirus infection in Wellington women. *Genitourin Med.* 68(4), 228-32.

- Mills, B (1992). Immunohistochemistry. In: Laboratory Methods Immunotechnology. Ed American Registry of Pathology (Washington), 247-255.
- Misra, J.S., Das, V., Srivastava, A.N., Singh, U.; Chhavi. 2006. Role of different etiological factors in progression of cervical intraepithelial neoplasia. *Diagn Pathol* 34(10), 682-5.
- Motoyama, S., Ladines-Llave, C.A., Luis Villanueva, S., Maruo, T., 2004. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci.* 50(1-2), 9-19.
- Munger, K., Baldwin, A., Edwards, K.M., Hayakawa, H., Nguyen, CL, Owens M, Grace M, Huh K., 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 78(21), 11451-60.
- Munro, J., Stott, F.J., Vousden, K.H., Peters, G., Parkinson, E.K., 1999. Role of the alternative INK4A proteins in human keratinocyte senescence: evidence for the specific inactivation of p16<sup>INK4A</sup> upon immortalization. *Cancer Res.* 59(11), 2516-21.
- Nair, P., Nair, M.K., Jayaprakash, P.G., Pillar, M.R., 1999. Decreased programmed cell death in the uterine cervix associated with high risk human papillomavirus infection. *Pathol Oncol Res.* 5, 95-103.
- Negri, G., Vittadello, F., Romano, F., Kasal, A., Rivasi, F., Girlando, S., Mian, C., Egarter-Vigl, E. p16<sup>INK4a</sup> expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. Negri G., 2004. *Virchows Arch.* 445(6), 516-20.
- Nieh, S., Chen, S.F., Chu, T.Y., Lai, H.C., Fu, E., 2003. Expression of p16<sup>INK4A</sup> in Papanicolaou smears containing atypical squamous cells of undetermined significance from the uterine cervix. *Gynecol Oncol.*, 91(1), 201-8.

- Oliveira, L.H., Rossa, M.L., Pereira, C.R., Vasconcelos, G.A., Silva, R.A., Barrese, T.Z., Carvalho, M.O., Abi, G.M., 2006. Human Papillomavirus status and cervical abnormalities in women from public and private health care in Rio de Janeiro state, Brazil. *Rev Med trop São paulo* 48(5), 279-285.
- O'Neill, C.J., McCluggage, W.G., 2006. p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol.* 13, 8-15.
- Park, J.S., Dong, S.M., Kim, S.H., Lee, J.Y., Um, S.J., Park, I.S., Kim, S.J., Namkoong, S.E., 2001. Detection of p16 gene alteration in cervical cancer using tissue microdissection and LOH study. *Cancer Letters* 136, 101-108.
- Park, J.S., Rhyn, J.W., Kim, C.J., Kim, H.S., Lee, S.Y., Kwon, Y.I., Namkoong, S.E., Sin, HS, Um S.J., 2003. Neoplastic change of squamo-columnar junction in uterine cervix and vaginal epithelium by exogenous estrogen in HPV-18 URR E6/E7 transgenic mice. *J Gynecol Oncol.* 89, 360-68.
- Popiolek, D., Ventura, K., Mittal, K., 2004. Distinction of low-grade squamous intraepithelial lesions from high-grade squamous intraepithelial lesions based on quantitative analysis of proliferative activity. *Oncol Reports* 11, 687-91.
- Queiroz, C., Silva, T.C., Alves, V.A., Villa, L.L., Costa, M.C., Travassos, A.G., Filho, J.B., Studart, E., Cheto, T., de Freitas, L.A., 2006. Comparative study of the expression of cellular cycle proteins in cervical intraepithelial lesions. *Pathol Res & Pract* 10, 731-37.
- Queiroz, C., Silva, T.C., Alves, V.A., Villa, L.L., Costa, M.C., Travassos, A.G., Filho, J.B., Studart, E., Cheto, T., de Freitas, L.A., 2006. P16I<sup>NK4a</sup> expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract.* 202, 77-83.

- Rocha, A.S., Edelweiss, M.I.A., Kirschnick, L., Bozzetti, M.C. Antibody Anti-p16<sup>ink4a</sup> in Cervical Cytology. Acta Cytol. AC-03508-07 Version 2 <http://www.acta-cytol.com/admin/copyright.pdf>
- Samama, B., Lipsker, D., Boehmm, N., 2006. P16 expression in relation to human papillomavirus in anogenotal lesions. Hum Pathol. 37, 513-519.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1999. Appendix E: commonly used techniques in molecular cloning. Purification of nucleic acids. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor, New York, pp. E.3-E.4 (3v).
- Santos, R.T.M., Wakamatsu, A.; Kanamura, C.T.; Nanagaki, S.e Pinto, G.A. 1999. Pricedimentos em Imuno-histoquímica e Hibridação “in situ”. In: Manual de Imuno-histoquímica. Eds: Alves, V.A.F.; Bacchi, C.E., Vassalo, J. (SP).p.229-259.
- Sarian, L.O., Derchain, S.F., Yoshida, A., Vassallo, J., Pignataro, F., De Angelo Andrade, L.A.L., 2006. Expression of cyclooxygenase - (COX-2) and Ki67 as relates to disease severity and HPV detection in squamous lesions of the cervix Gynecol Oncol. 102(3), 537-41.
- Schlecht, N.F., Trevisan, A., Baggio, M.L., Duarte-Franco, E., Greenberg, M.D., Rohan, T.E., Ferenczy, A., Villa, L.L., Franco, E.L., 2006. Lack of agreement between cervicography and cytology and the effect of human papillomavirus infection and viral load. J Low Genit Tract Dis. 10(4), 229-37.
- Sichero, L., Ferreira, S., Trottier, H., Duarte-Franco, E., Ferenczy, A., Franco, E.L., Villa, L.L., 2007. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. Int J cancer 120(8), 1763-8.

- Tsai, J.H., Peng, Y.W., Lin, L.Y., Chou, M.C., Chiou, H.L., 2005. An association between human papillomavirus 16/18 deoxyribonucleic acid in peripheral blood with p16 protein expression in neoplastic cervical lesions. *Cancer Detect Prev.* 29, 537-43.
- Tu, S.P., Jackson, S.L., Yasui, Y., Deschamps, M., Hislop, T.G., Taylor VM., 2005. Cancer preventive screening: A cross-border comparison of United States and Canadian Chinese women. 41, 36-46.
- Van de Putte, G., Holm, R., Lie, K., Tropé, C.G., Kristensen, G.B., 2004. Expression of p27, p21, and p16 protein in early squamous cervical cancer and its relation to prognosis. *Gynecol Oncol* 89, 140-147.
- Virmani, A.K., Muller, C., Rathi, A., Zochbauer-Mueller, S., Mathis, M., Gazdar, A.E., 2001. Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 7(3), 584-9.
- Volgareva, G., Zavalishins, L., Andreeva, Y., Frank, G., Krutikova, E., Golovina, D., Bliev, A., Spitkovsky, D., Ermilova, V., Kissel'jov, F., 2004. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer* 4, 58-67.
- Walts, A.E., Lechago, J., Bose, S., 2006. P16 and Ki67 immunostaining is a useful adjunct in the assessment of biopsies for HPV-associated anal intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 30(7), 785-91.
- Wong, Y.F., Chung, T.K.H., Cheung, T.H., Nobori, T., Yu, A.L., Yu, J., Batowa, A., Lai, K.W.H., Chang, A.M.Z., 1999. Methylation of p16<sup>INK4A</sup> in primary gynecologic malignancy. *Cancer Letters* 136, 231-35.
- Wright, J.D., Li, J., Gerhard, D.S., Zhang, Z., Huettner, P.C., Powell, M.A., Gibb, R.K., Herzog, T.J., Mutch, D.G., Trinkaus, K.M., Rader, J.S., 2005. Human papillomavirus type and

tobacco use as predictors of survival in early stage cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* 98, 84-91.

Wright TC Jr, Cox JT, Massad LS, et al. 2001 Consensus Guidelines for the management of womwn with cervical cytological abnormabilities. *JAMA* 2002; 287:2120-9.

Yang, H.J., Liu, V.W.S., Wang, Y., Chan, K.Y.K., Tsang, P.C.K., Khoo, U.S., Cheung, A.N.Y., Nogan, H.Y.S., 2004. Detection of hypermetilated genes in tumor and plasma of cervical cancer patients. *Gynecol Oncol.* 93, 435-40.

Yokoyama, M., Iwasaka, T., Nagata, C., Nozawa, S., Sekiya, S., Hirai, Y., Kanazawa, T., Sato, S., Hoshiai, H., Sugase, M., Kawana, T., Yoshikawa, H., 2003. Prognostic fgactors associated with the clinical outcome of cervical intraepithelial neoplasia: a cohort study in Japan. *Cancer Letters* 192, 171-179.

Yoshida, T., Sano, T., Kanuma, T., Owada, N., Sakurai, S., Fukuda, T., Nakajima, T., Japan., 2007. Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the type distribution, viral load, and physical status of human papillomavirus in liquid-based cytology samples from cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer.* 15, (Epub ahead of print]

## PERSPECTIVAS

O rastreamento para o câncer cervical através da citologia e a intervenção, quando necessária, têm reduzido os índices de câncer em até 80% nos EUA. Entretanto, é dispendioso e, muitas vezes, inconveniente [230].

A infecção genital pelo HPV é a doença sexualmente transmissível mais comum entre as mulheres [11] e está comprovado cientificamente, que o carcinoma cervical pode ser uma consequência desta infecção e, portanto, é ponto crucial o desenvolvimento de mecanismos de proteção, principalmente vacinas, os quais previniriam a infecção viral e, em consequência, a incidência de carcinoma cervical decorrente deste agente [230, 231].

Porém, a vacina sintetizada e disponível, não protege contra todos os tipos de HPV ou da doença já existente; assim, programas de rastreamento citológicos necessitam ser ainda, estabelecidos. Um outro fator importante é o custo da vacinação que ultrapassa níveis considerados plausíveis para a maioria da população.

Estudos têm mostrado que, uma maneira mais eficaz de relacionar custo-benefício, seria combinar o rastreamento citológico com a vacina alvo para HPV 16 e 18, os tipos virais oncogênicos mais freqüentes [230].

A indução de uma forte resposta imunológica celular é certamente indispensável para qualquer estratégia de vacinação terapêutica e pode ser crítica para imunização por longo tempo na profilaxia das infecções. Nas infecções pelo HPV, a regressão da lesão está associada com uma resposta regulada e dependente de células T CD4+ e com uma ação efetora citotóxica das células T CD8+ [39].

As pacientes com deficiência de imunidade celular, capazes de produzir anticorpos normalmente, se recuperam de modo precário das infecções. Entretanto, aquelas que carecem de

anticorpos, com resposta normal pela imunidade celular, não costumam sofrer em decorrência das doenças virais. Macrófagos estão freqüentemente envolvidos na fagocitose de vírus e na disseminação pelo organismo [232].

Na infecção pelo Papilomavírus há pouca destruição de tecido, pois não há morte celular; logo, não havendo lise, não há proteção ou liberação de produtos para que a resposta imune seja ativada [233-235]. Já, quando a mucosa ou pele infectada está danificada, a proteína do HPV será fagocitada pelos macrófagos e apresentada ao sistema imune. Além disto, o vírus possui muitos mecanismos de evasão da indução da resposta imune [128].

O desenvolvimento de vacinas é um processo extremamente complexo e teve início em 1993 , com base no descobrimento por parte de vários grupos científicos que, a proteína L1 do capsídeo viral poderia atuar como partícula semelhante a vírus (VLP), quando expressa como proteína recombinante em sistema eucariótico heterólogo e purificado [148, 236, 237].

As VLPs são utilizadas como veículo para facilitar a apresentação de antígenos ao sistema imune celular ou humoral [148]. As VLPs e as VLPs quiméricas são imunógenos desenvolvidos para obter respostas antivirais e tumorais de células B e T e se ligam à células que expressam as APCs (células apresentadoras de antígenos) como MHC II (complexo maior de histocompatibilidade) classe II, células dendríticas e outras [235].

A vacinação representa uma forma mais dispendiosa de combater a infecção; entretanto, mais eficiente [230]. Normalmente, vacinas efetivas contra o vírus atuam através da geração de anticorpos neutralizantes e a proteção é proporcional à quantidade de anticorpos gerados no sítio de entrada e permanecem, enquanto a neutralização persistir [236]. Estudos longitudinais são disponíveis com alguns tipos virais, o que demonstra que o vírus induz baixos títulos de anticorpos neutralizantes e, que alguns indivíduos, parecem adquirir e eliminar a infecção sem

originar uma quantidade mensurável de anticorpos.[236]. (Podem ser empregados dois tipos de vacinas, ou a combinação das duas: profiláticas (prevenção) e terapêutica. As primeiras protegem contra o agente etiológico específico e contra a aquisição da doença, mas necessitam o estabelecimento de programas de vacinação em massa para o benefício da população em geral [230]. Podem ser aplicadas antes da exposição ao vírus e, para ser efetiva, deve ser capaz de estimular a formação de anticorpos neutralizantes, preferencialmente na superfície da mucosa. Após a infecção, os anticorpos contra o HPV são direcionados contra epítomos conformacionais liberados e à proteína maior do capsídeo viral L1. Assim, a vacina foi desenvolvida com base nos antígenos maior do capsídeo viral L1 e L2, respectivamente. A expressão de L1 recombinantes (principal proteína do capsídeo viral) gerou as partículas semelhantes a vírus (VLPs) as quais foram morfológicamente e imunologicamente idênticas aos vírions. Entretanto, não contém o DNA viral, não podendo, portanto, se replicar e causar infecção ou risco oncogênico. Nestes casos, são aplicados partículas de L1 ou VLPs L1 e L2.

A vacina terapêutica seria empregada quando a infecção já está estabelecida, induzindo a resposta específica mediada por células T e levando à regressão da lesão já existente. Teria um impacto imediato na incidência do carcinoma cervical [234]. Para este tipo de vacina, é proposta a utilização das proteínas precoces, em particular E6 e E7 como antígenos, uma vez que, estão envolvidas na proliferação e transformação celulares .

Resultados iniciais com as vacinas VLPs indicam uma proteção de 100% em 5 anos de acompanhamento. Em um estudo, 3,5 anos após a vacinação com HPV-16L1 VLPs, a proteção permanecia em 94% ( IC95%: 88-98%), comparada com 100% (IC95%: 90-100%) em 17,4 meses. Em outro estudo, foi demonstrada uma proteção de 94.3% (IC95%: 63.2-99.9%) contra

esta infecção persistente (definida pelo menos por 6 meses) até 4,5 anos após a vacinação [230]. Estudos estão sendo realizados com objetivo de responder esta questão.

Nos Estados Unidos, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou a vacina preventiva contra dois tipos agressivos de HPV (16 e 18) e dois tipos que causam lesão de baixo grau (6 e 11), o que deve cobrir cerca de 70% dos casos. Fabricada pela Merk Sharp & Dohme, custa em média, 120 dólares cada dose. A vacina deve ser aplicada em três doses: a segunda dose, 60 dias depois da primeira e, a terceira, 180 dias após a primeira. Esta aprovação se deu em 8 de junho de 2006 e é indicada na imunização de mulheres entre 9 e 26 anos de idade.

A vacina no Brasil foi aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, no dia 28 de agosto de 2006 [238]. (Fonte: Cláudia Collussi. Folha on line de 29 de agosto de 2006, [www2.uol.jornaldecampos/681/hpv.htm](http://www2.uol.jornaldecampos/681/hpv.htm)) . Entretanto, alguns pontos devem ser levados em consideração:

- Duração da proteção: A persistência de anticorpos neutralizantes na superfície da mucosa é imperiosa para proteção, porém, tem sido demonstrada uma queda de anticorpos em torno de 5 anos após a vacinação.

- Especificidade: Anticorpos gerados pelas vacinas são tipo-específicos, não prevenindo contra todos os tipos oncogênicos.

- População-alvo: A vacina é eficaz somente se administrada antes da exposição ao vírus; o que sugere que nem todas as mulheres são abrangidas por esta forma de prevenção.

- Homens e indivíduos imunocomprometidos: Como a relação entre homens e mulheres é uma das formas de transmissão mais comum, atualmente poucos dados são disponíveis sobre a resposta imune do VLP HPV em homens e indivíduos imunocomprometidos são menos responsivos à vacina profilática convencional.

- Custos: Atualmente os custos são elevados, necessitando o desenvolvimento de outras formas de imunização mais estáveis e viáveis economicamente.

Com base nesta trajetória de estudos e busca incansável por parte da comunidade científica, observamos que a vacina não protege contra os tipos de HPV menos comuns, portanto, os exames de rastreamento devem continuar sendo realizados para detectar as lesões pré-cancerosas e permitir o tratamento precoce; bem como as pesquisas, a fim de ampliar o espectro de ação das vacinas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. N, V., *Editorial*. Revista Brasileira de Sexualidade Feminina, 1998. **9(2)**: p. 139.
2. Pater A, B.M., Pater M, *Oncogenic transformation by Human Papillomavirus type 16 deoxyribonucleic acid in the presence of progesterone or progestins from oral contraceptives*. Am J Obstetr Gynecol, 1990. **162**: p. 1099-103.
3. M.K., D., *New Markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberant oncogenic papillomaviruses infections*. Eur J Cancer, 2002. **38**: p. 2229-2242.
4. Horng JT, K.K., Wu, LC, Huang HD, Lin FM, Huang SL, Lai HGC, Chu TY. , *Identifying the combination of genetic factors that determine susceptibility to cervical cancer*. IEEE Trans Inf Technol Biomed 2004. **8(1)**: p. 59-66.
5. Lambert APF, A.F., Schmitt VM. , *P16INK4A expression in cervical premalignant and malignamnt lesions*. . Experimental and Molecular Pathology 2006. **80**: p. 192-196.
6. Tjalma WA, A.M., Paavonem J, Waes TR, Bogers JJ. , *Prophylactic human papillomavirus vaccines: the beginning of the end of cervical cancer*. . Int J Gynecol Câncer 2004. **14**: p. 751-761.
7. Duarte-Franco E, F.E., *Other Gynecologic Cancers: endometrial, ovarian, vulvar and vaginal cancers*. . BMC Womens Health 2004. **25(4 Suppl 1)**: p. S14.
8. Câncer, I.N.d. *Estimativa 2006. Incidência de Câncer no Brasil*. 2006 [cited 10 de Dezembro de 2006].
9. Hartmann KE, N.K., Hall S, Myers E., *Screening for Cervical Cancer – Agency for Healthcare Research and Quality*. 2002.
10. LA, P., *Genital HPV: Links to cervical cancer, treatment, and prevention*. Clin Lab Sci 2001. **14(3)**: p. 183-6.; quiz 193.

11. Burchell AN, W.R., de Sanjosé S, Franco EL., *Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection*. Vaccine, 2006. **24S3**: p. S3/52-S361.
12. Veljkovic M, K.V., Popovic J. , *Effects of oral contraception on carcinogenesis*. Facta Universitatis, 2004. **11**(1): p. 11-15.
13. Kanao H, E.T., Ueda Y, Fujita M, Nakashima R, Ueno Y, Miyatake T, Yoshizaki T, Buzard GS, Kimura T, Yoshino K, Murata Y. , *Correlation between p14ARF/p16INK4A expression and HPV infection in uterine cervical cancer*. Cancer Letters, 2004. **213**: p. 31-37.
14. Ishikawa M, F.T., Saito M, Nindi I, Ono A, Kubushiro K, Tsukazaki K, Mukai M, Nozawa S., *Overexpression of p16INK4a as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia*. Int J Gynecol Cancer 2006. **16**: p. 347-353.
15. Schneede, P., *Genital human papillomavirus infections*. . Curr Opinion in Urology 2002. **12**: p. 57-61.
16. N., M., *Human Papillomavirus and cancer: The epidemiological evidence*. J. of Clin Virol, 2000. **19**: p. 1-5.
17. Medeiros LR, d.M.E.A., Hilgert JB, Zanini RR, da Silva OB, Bozzetti MC, Mylius LC. , *Vertical transmission of the Human Papillomavirus: a systematic quantitative review* Cad. Saúde Pública 2005. **21**(4): p. 106-1015.
18. Munoz N, C.X., de Gonzalez AB, Gissman L., *Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer*. Vaccine, 2006. **21**(24S3): p. S1-S10.

19. Ferrera A, V.J., Fihueroa M, Toro LA, Claros JM, Barahona O, Melchers WJG. , *Co-factors related to the causal relationship between Human Papillomavirus and invasive cervical cancer in Honduras.* . International Journal of Epidemiology 2000. **29**: p. 817-25.
20. Juneja A, S.A., Mitra AB, Pandey A. , *A Survey on a risk factors Associated with cervical Câncer.* . Indian J of Cancer, 2003. **40**: p. 15-22.
21. Harper DM, L.M., Noll WW, Belloni DR, Cole BF. , *Factors affecting the detection rate of Human Papillomavirus.* Ann Fam Med 2003. **1**: p. 221-227.
22. Agorastos T, D.K., Lioveras B, de Sanjose S, Kornegay JR, Bonti H, Nosch FX, Constantinidis T, Bontis J. , *Human papillomavirus testing for primary screening in women at low risk of developing cervical cancer.* . Ginecologic Oncology, 2005. **96**: p. 724-730.
23. Rousseau M, F.E., Villa LL, Sobrinho JP, Termini L, Prado JM. & Roban TE, *A cumulative case-control study of risk factor profiles for oncogenic and non-oncogenic cervical Human papillomavirus infection.* . Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 2000. **9**: p. 469-476.
24. Jacobs MV, S.P., Voorhorst FJ, Dillner J, Forslund O, Johansson B, von Knebel Doeberitz M, Meijer CJ, Meyer T, Nindl I, Pfister H, Stockfleth E, Strand A, Wadell G, Walboomers JM., *Reliable high risk HPV DNA testing by polimerase chain reaction: an intermethod and intramethod comparison.* J.Clin. Pathol. , 1999. **52**: p. 498-503.
25. Behtash N, M.N., *Cervical Cancer: Screening and prevention.* . Asian Pac J Cancer Prev 2006. **7**(4): p. 683-686.
26. Murphy N, R.M., Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F, Turner M, McGuinness E, Griffin M, Martin C, Sheils O, O'Leary JJ, *P16INK4A as a marker for*

- cervical dyskariosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and Thin Prep TM smears.* . J Clin Pathol, 2003. **56**: p. 56-63.
27. Kijima H, U.Y., Osamura Y. , *Histopathology and tumor markers. Review.* Rinsho Byori., 2003. **51**(12): p. 1203-1215.
28. Svare EL, K.H., Poll P, Tjong-A-Hung SP, Sschegger J. Risk factors for HPV Detection in Archival Pap smears. , *A population-based study from Greenland and Denmark.* . Eur J Cancer 1998. **34**(8): p. 1230-1234.
29. Kaufman RH, A.E., Icenogle J, Reeves W. , *Human papillomavirus testing as triage for atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesions: Sensitivity, specificity, and cost-effectiveness.* AmJ Obstet Gynecol 1997. **177**: p. 930-936.
30. Bibbo M, M.e.S.F., A., *Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital.* 1998, Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter.
31. IH., F., *HPV Vaccines.* Int J Gynecol Obstetr, 2006. **94**(suppl 1): p. S81-S88.
32. Munoz N, M.F., Passo H, Molano M, van de Brule AJ, Ronderos M, Munoz A., *Instituto Nacional de Cancerología, Incidence, duration and determinants of cervical human papillomavirus infection in an cohort of Colombian women with normal cytological results.* . J Infect Dis, 2004. **12**(190): p. 2077-2087.
33. EM., B., *Human Papillomavirus and cervical Cancer.* . Clinical Microbiology Reviews 2003. **16**: p. 1-17.
34. Alani RM, M.K., *Human Papillomaviruses.* Science & Medicine 1998. **May-Jun**(28-35.).

35. Chan W, K.G., Bernard H. . and *Progesterone and Glucocorticoid response elements occur in the long control region of several Human Pappilomaviruses involved in anogenital neoplasia.* . J. Virol., 1989. **32**: p. 61-69.
36. Moodley M, M.J., Chetty R, Herrington CS. , *The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: a review.* . Int J Gynecol Cancer., 2003. **13**(2): p. 103-110.
37. Park RB, A.E., *Genetic analysis of High-risk in episomal maintenance of human papilloomavirus genomes in primary human keratinocytes.* . J. Virol., 2002. **76**: p. 11359-64.
38. Webster K, T.A., Gaston K. J Gen Virol 2001; 82:201-213. . *Oestrogen and progesterone increase the levels of apoptosis induced by human papillomavirus type 16 E2 e E7 proteins.* J Gen Virol, 2001(82): p. 201-213.
39. M., S., *Prognostic factors and new therapeutic approaches to cervical cancer.* Virus Research, 2006. **89**: p. 241-248.
40. LL., V., *Human Papillomavirus and Cervical Cancer.* Adv in Cancer Reserch, 1997. **71**: p. 321-341.
41. Tsuda H, H.Y., Nishimura S, Kawamura N, Inoue T, Yamamoto K. , *Relationship between HPV typing abnormality og G1 cell cycle regulators in cervical neoplasia.* . Gynecologic Oncology, 2003. **91**: p. 476-485.
42. Nishimura A, O.T., Ishimoto A, Dowhanick JJ, Frizzel AA, Howley PM, Sakai H. J Virol *Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition.* . J Virol., 2000. **74**(8): p. 3752-60.

43. Bosch FX, S.S.d., *Human Papillomavirus in Cervical cancer*. Curr Oncol Research 2002. **4**: p. 175-183.
44. Finzer P, A.-L.A., Rosl F. , *The Role of Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 apoptosis*. Cancer Letters, 2002. **188**: p. 13-24.
45. Ferenczy A, J.A., *Tissue effects and host response. The key to the rational triage of cervical neoplasia*. . Obstet Gynecol Clin North Am, 1996. **23**: p. 759-782.
46. Keating JT, I.T., Crum CP. , *Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis*. Adv.Anat. Pathol 2001. **8**: p. 83-92.
47. EJ., A., *Verrugas*, in *Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infeciosas.*, E.N. Schachter M, Eisenstein BI, Medoff G., Editor. 2002, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. p. 332-337.
48. Rivoire W, C.E., Monego HI, Appel M, Reis R., *Lesões de Baixo e Alto grau no colo uterino.*, in *Rotinas em Ginecologia.*, M.C. Freitas F, Rivoire W, Passos EP., Editor. 2001, ArtMed: Porto Alegre. p. 261-272.
49. Duensing S, D.A., Crum C. & Münger K. , *Human Papillomavirus type16 E7 oncoprotein-induced abnormalcentrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype*. . Cancer Research 2001. **61**: p. 2356-2360.
50. Kruse AJ, B.J., Helliesen T, Kjellevoid KH, Robboy SJ. , *Prognostic value and reproducibility of koilocytosis in cervical intraepithelial neoplasia*. Int J Gynecol Pathol. , 2003. **22**(3): p. 236-239.
51. Roteli-Martins C, A.V., Santos TM, Martinez EZ, Syrjanen KJ, Derchain SFM. , *Value of morphological criteria in diagnosing cervical HPV lesions confirmed by In situ hybridization and Hybrid capture assay*. Pathol Res Pract, 2001. **197**: p. 677-682.

52. Boon ME, B.L., de Bosschere MJ, Verbruggen BS, Kok LP, *Koilocytosis and squamous (pre)neoplasia as detected in population-based cervical screening: practice and theory*. Eur J Gynaecol Oncol 2005. **26**(5): p. 533-6.
53. Rochanawutanon M, S.S., *The histopathologic patterns of cervical lesions and visual inspection with acetic acid on excised uterine cervixes*. Int J Gynecol Cancer, 2007. **14**.
54. Herrington CS, E.M., Charnock FM, Gray W, Mc Gee JOD. , *HPV testing in patients with low grade cervical cytological abnormalities: a follow up study*. J Clin Pathol 1996. **49**: p. 493-496.
55. Coker AL, S.M., Fadden MK, Pirisi L. , *Intimate partner violence and cervical neoplasia*. J Womens Health Gend Based Méd 2000. **9**(9): p. 1015-1023.
56. Villa LL, S.L., Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL. 81, *Molecular variants of Human Papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia*. J.Gen Virol., 2000. (Pt 12): p. 2959-2968.
57. Yokoyama M, I.T., Nagata C, Nozawa S, Sekiya S, Hirai Y, Kanasawa K, Sato S, Hoshiai H, Sugars M, Kawana T, Yoshikawa H., *Prognostic factors associated with the clinical outcome cervical intraepithelial neoplasia: a cohort study in Japan*. Cancer Letters, 2003. **192**: p. 171-179.
58. Silins I, W.X., Tadesse A, Jansen KU, Schiller JT, Avall-Lundqvist E, Frankendall B, Dillner. , *A population-based study of cervical carcinoma and HPV in Latvia*. J. Gynecologic Oncology, 2004. **93**: p. 484-492.
59. Munoz N, F.S., Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX, *International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study*

- Group. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. . Lancet, 2002. 359(9312): p. 1093-1101.*
60. Hildesheim A, L.A., Greenberg, MD, Morales J, Shiffman M. , *Utility of liquid-based cytology for cervical carcinoma screening: results of a population-based study conducted in a region of Costa Rica with a high incidence of cervical carcinoma.* Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 1994. **87(2)**: p. 48-55.
  61. ME., H., *Infection with Human Papillomavirus: Update on epidemiology, diagnosis and treatment. . Cur Infectious Dis Reports, 2000. 2: p. 18-24.*
  62. Richardson H, K.G., Tellier P, Voyer H, Abrahamowicz M, Ferenczy A, Coutlee F, Franco EL. , *The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2003. **12(6)**: p. 485-490.
  63. Schlecht NF, P.R., Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JCM, Ferenczy A, Rohan TE, Villa LL, Franco EL. , *Human Papillomavirus and time to progression and regression of Cervical Intraepithelial neoplasia. . J Natl Cancer Inst, 2003. 95: p. 1336-1343.*
  64. Sellors JW, K.T., Kaczorowski J, Mahony JB, Lytwyn A, Chong S, Sparrow J.& Lorincz A. , *Incidence clearance and predictors of human papillomavirus infection in women.* CMAJ, 2003. **168**: p. 421-425.
  65. Noronha V, M.W., Villa L, Brito A, Macedo R, Bisi F, Mota R, Sassamoto K, Monteiro T, Linhares A. , *Papilomavírus humano associado a lesões de cérvix uterina.* Rev Soc Bras Med Tropical 1999. **32**: p. 235-240.

66. Murta EFC, S.M.d., Araújo Junior E, Adad AJ. , *Incidence of Gardnerella vaginalis, Cândida sp and Human papillomavirus in cytological smears.* . São Paulo Med J/Rev Paul Med, 2000. **118**(4): p. 105-108.
67. Lorenzato F, H.L., Terry G, Singers A, Santos LC, De Lucena Batista R, Lubanbo T. 2000; 10: 143-150. and *The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife ( Brazil).* Int J Gynecol Cancer, 2000. **10**: p. 143-150.
68. Becker E, E.M., Nonnenmacker B, Bozzetti M.C. , *Prevalence and epidemiologic correlates of atypical squamous cells of undetermined significance in womwn at low risk for cervical cancer.* . Diagn Cytopathol 2001. **24**(4): p. 276-282.
69. Nonnemacher B, P.J., Bozzetti ,MC, Mielzinska-Lohnas I, Lorincz AT, Ikuta N, Schwartzmasn G, Villa L, Schiller JT, Franco E. , *Epidemiologic correlates of antibody response to human papillomavirusamongn womwn at low risk of cervical cancer.* Int J SDT & AIDS 2002. **13**(D639): p. 1-8.
70. Longatto Filho A, U.M., Shirata NK, Pereira SMM, Namiyama GM, Kanamura CT, Santos G da C, de Oliveira MA, Wakamatsu A, Nonogaki S, Roteli-Martins C, di Loreto C, de Castro Ferraz MGM , Maeda MY, Alves VAF,Syrjanen K., *Immunocytochemical expression of p16INK4A and Ki-67 in cytologically negative and equivocal pap smears positive for oncogenic human papillomavirus.* Int J Gynecol Pathol, 2005. **24**(2): p. 118-124.
71. Pinto AP, T.S., Cruz OR. , *Co-Fatores do HPV na oncogênese cervical.* Rev Assoc Med Brás, 2002. **48**(1): p. 73-78.
72. Pereyra EAG, P.C., *Entendendo Melhor a Infecção pelo Papilomavírus Humano.* Shering, in ARTSMED. 2003: São Paulo.

73. Villa LL, F.E., *Epidemiologic Correlates of Cervical Neoplasia and risk of Human Papillomavirus infection in asymptomatic women in Brazil*. J of the Natl Cancer Inst, 1989. **81**: p. 332-340.
74. Boyle DCM, S.J., *Infection and cervical intraepithelial neoplasia*. Int J Gynecol Cancer, 1999. **9**: p. 177-186.
75. S., T., *Major avoidable risk factors of cancer*. Cancer Letters, 1999. **143(suppl)**: p. S19-S23.
76. Castellsagué X, B.F., Muñoz N. 2002; 89:191-199. and *Enviromental co-factors in HPV carcinogenesis*. Virus Research, 2002. **89**: p. 191-199.
77. Frega A, S.P., De Ioris A, Piazzè JJ, Fambrini M, Marchionni M, Cosmi EV. , *Young women, cervical intraepithelial neoplasia and Human papillomavirus: risk factors for persistence and recurrence*. Cancer Letters, 2003. **196(2)**: p. 127-134.
78. Snowwhite IV, J.W., Dumestre J, Dunlap K, Hagensee ME. , *Comparative analysis of methods for collection and measurement of cytokines and immunoglobulins in cervical and vaginal secretions of HIV and HPV infected women*. Journal of Immunological Methods 2002. **263**: p. 85-95.
79. White WI, W.S., Bonnez W, Rose RC, Koenig S, Suzich JA., *In vitro infection and type-restricted antibody-mediated neutralization of authentic Human Papillomavirus type 16*. . Journal of virology 1998. **72**: p. 959-964.
80. Passmore JA, M.M., Denny L, Sampson C, Marais DJ, Allan B, Gumbi PP, Hitzeroth II, Rybicki EP, Williamson AL. , *Comparison of cervical and blood T-cell responses to human papillomavirus-16 in women with human papillomavirus-associated cervical intraepithelial neoplasia*. Immunology. , 2006. **119(4)**: p. 507-514.

81. Nimako M, F.A., Wilkinson GWG, Borysiewicz LK, Man S. , *Human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III* . Cancer Research 1997. **57**: p. 4855-4861.
82. Bontkes HJ, D.G.T., Walboomers JM, Schiller JT, Dillner J, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Scheper RJ, Meijer CJ., *Immune response against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia.II. Systemic but not local IgA responses correlate with clearance of HPV 16*. Journal of General Virology 1999. **80**: p. 409-417.
83. De Gruijl TD, B.H., Walboomers JMM, Coursaget P, Stukart MJ, Dupuy C, Kueter E, Verheijen RHM, Helmerhorst TJM, Duggan-Keen MF, Stern PL, Meijer CJLM, Scheper RJ. , *Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. I. Differential T-helper and IgG responses in relation to HPV infection and disease outcome*. Journal of General Virology 1999. **80**: p. 399-408.
84. Mota F, R.N., Chong S, Singer A, Chain B *The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium*. Immunology, 1999. **116**: p. 33-40.
85. Crowley-Nowick PA, E.J., Vermund SH, Douglas SD, Holland CA, Moscicki AB. , *Cytokine profile in genital tract secretions from female adolescents: Impact of human immunodeficiency virus, human papillomavirus , and other sexually transmitted pathogens*. . J Infect Dis, 2000. **181**: p. 939-945.

86. El-Sherif AM, S.R., Tighe PJ, Jenkins D. , *Quantitative analysis of IL-10 and IFN- $\gamma$  mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical pre-cancer.* . J Pathol, 2001. **195**: p. 179-185.
87. L, B., *Interactions of the female hormonal environment, susceptibility to viral infections, and disease progression.* Aids Patient Care and STDs, 2002. **16**(5): p. 211-221.
88. Wallin KL, W.F., Luostarinen T, Angström T, Antilla T, Bergmann F, Hallmans G, Ikaeimo I, Koskela P, Lehtinen M, Stendahl P, Paavonen J, Dillner J. , *A population-based prospective study of Chlamydia trachomatis infection and cervical carcinoma.* . Int.J.Cancer, 2002. **101**: p. 371-374.
89. Dillner J, L.P., Lehtinen M, Eklund C, Heino P, Wiklund F, Hallmans G, Stendhal A. , *A population-based seroepidemiological study of cervical cancer.* . Cancer Research, 1994. **54**: p. 134-141.
90. Koskela, P., Antilla T, Bjorge T, Brunsvig A, Dillner J, Hakama M, Hakulinen T, Jellun E, Lehtinen M, Lenner P, Luostarinen T, Pukkala E. et al. Int J Cancer 2000; 85(1):35-39. , *Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer.* Int J Cancer, 2000. **85**(1): p. 35-39.
91. Antilla T, S.P., Koskella P, Bloigu A, Dillner J, Ikaheimo I, Jelum E, Lehtinen M, Lenner P, Hakulinen T, Narvanen A, Pukkala E, Thoresen S, Youngman L, Paavonen J. et al., *Serotypes of Chlamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma.* . JAMA, 2001. **285**: p. 47-51.
92. Harris TG, K.S., Kiviat NB, Mao C, Agott SN, Feng Q, Koutsky LA . 2004; 159(9):834-42., *Cigarette smoking, oncogenic human papillomavirus, Ki67 antigen, nad cervical intraepithelial neoplasia.* Am J Epidemiol 2004. **159**(9): p. 834-842.

93. Atalah ES, U.C., Rebolledo AA, Villegas RA, Medina EL, Csendes AJ. Rev Méd Chile 2001; 129: 597-603., *Alimentación, tabaquismo e historia reproductiva como factores de riesgo Del cáncer de cuello Del útero*. Rev Méd Chile, 2001. **129**: p. 597-603.
94. Moore TO, M.A., Carrasco D, Vander Straten M, Arany I, Au W, Tyring SK. , *Human Papillomavirus, smokimng and cancer*. J Cutan Med Surg, 2001. **5**(4): p. 323-328.
95. Nunez JT, D.M., Pino G, Giron H, Bolet B. , *Smoking as a risk factor for preinvasive and invasive cervical lesions in female sex workers in Venezuela*. . Int J Gynecol Obstet, 2002. **79**(1): p. 57-60.
96. Coker AL, B.S., Wlliams A, Gerasimova T, Pirisi L. 2002; 26: 121-128. and *Active and passive smoking, high-risk human papillomavirus and cervical neoplasia*. Cancer Detection and Prevention 2002. **26**: p. 121-128.
97. Wyatt SW, L.M., Bottorf D, Ross, F. , *History of tobacco use among Kentucky Women diagnosed with invasive cervical cancer:1997-1998*. Journal of the Kentucky Medical Association 2001. **99**: p. 537-539.
98. Ho GYF, B.R., Beardsley L, Chang, CJ, Burk RD. , *Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women*. N Engl J Med 1998. **338**: p. 423-428.
99. Lacey JV, B.L., Barnes WA, Gravitt PE, Greenberg MD, Hadjimichael OC, Mc Gowan L, Mortel R, Schwartz PE, Kurman RJ, Hildesheim A. , *Use of hormone replacemete therapy and denocarcinomas and squamous cell carcinomas of the uterine cervix*. . Gynecologic Oncology, 2000. **77**: p. 149-154.
100. Lea JS, C.R., Kurien A, Schorge JO, Miller DS, Minna JD, Muller CY. , *Aberrant p16 methylation is a biomarker for tobacco exposure in cervical squamous cell carcinogenesis*. . Am J Obstet Gynecol 2004. **190**(3): p. 674-679.

101. Murta EFC, d.S.M., Adad SJ, Junior EA. , *Infecção pelo Papilomavírus Humano em adolescentes: Relação com o método anticoncepcional, gravidez, fumo e achados citológicos.* . RBGO, 2001. **23**(4): p. 217-221.
102. Michelin D, G.L., Street D, Potkul RK, Fisher S, Kaufmann AM, Qiao L, Schreckenberger, C. , *Regulation of Human papillomavirus type 18 in vivo: Effects of estrgen and progesterone in transgenic mice.* Gynecol Oncol 1997. **66**: p. 202-208.
103. Ferenczy A, M.M., Mansour N. , *Human Papillomavirus infection in postmenopausal womwn with and without hormone therapy.* Obstet Gynecol, 1997. **90**: p. 7-11.
104. Herrero R, C.P., Schiffmann M., Bratti MC, Hildesheim A., Morales J., Alfaro M, Sherman ME, Walcholder S, Chen S, Rodrigues AC, & Burk RD. , *Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica.* . J Infect Dis, 2005. **191**(11): p. 1796-1807.
105. Brenteni MM, F.J., *Receptores Esteroidicos in Ginecología Endocrina.* 1995: Ed Atheneu.
106. Hildesheim A, R.W., Brinton LA, Lavery C, Brenes M, De La Guardia ME, Godoy J, Rawls WE. , *Association of oral contraceptive uise and human Papillomaviruses in invasive cervical cancer.* Int J Cancer, 1990. **45**(5): p. 860-864.
107. Herrero R, B.L., Reeves WC, Brenes MM, Britton RC de, Tenorio F, Gaitan E. , *Injectable contraceptives and risk of invasive cervical cancer: evidence of an association.* . Int J Cancer, 1990. **46**(1): p. 5-7.
108. Harper JM, L.A., Rosenthal DL, Wiesmeier E, Hunt IF, Swendseid ME, Haile RW. , *Erytrocite folate levels, oral contraceptive use and abnormal cervical cytology.* . Acta Cytol, 1994. **38**(3): p. 324.

109. Kjeldsberg L, H.G., Ahren AM, Johansson R, Bergman F, Wadell G, Angstrom T, Dillner J. , *Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as a risk factors for cervical intra-epitelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection*. Br J Cancer, 2000. **82**(7): p. 1332-1338.
110. Moreno V, B.F., Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, Herrero R, Franceschi S., *International Agency for Research on Cancer Multicentric Cervical Cancer Study Group. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study*. Lancet, 2002. **359**(9312): p. 1085-1092.
111. Matos A, M.J., Pinto D, Medeiros R. , *The influence of smoking and other cofactors on the time to onset to cervical cancer in a southern European population*. Eur J Cancer Prev, 2005. **14**(5): p. 485-491.
112. C., L.V., *Oral contraceptives and cancer*. Minerva Ginecol, 2006. **58**(3): p. 209-214. Review. Italian.
113. Monsonego J, M.H., Catalan F, Coscas Y, Zerath L, Sastre X., *Estrogen and progesterone receptors in cervical human papillomavirus related lesions*. Int J Cancer, 1991. **19**: p. 533-539.
114. Kedzia W, G.-J.A., Kwasniewska A, Schmidt M, Miturski R, Spaczynski M. , *Relationship between HPV infection of the cervix and blood serum levels of steroid hormones among pre- and postmenopausal women*. . Eur J Gynecol Oncol, 2000. **221**: p. 177-179.
115. Khare S, K.K., Tang, SC, Pater MM, Pater A. , *Up-regulation of hormone response of human papillomavirus type 16 expression and increased DNA-protein binding by*

- consensus mutations of viral glucocorticoid response elements. J Med Virol, 1996. 50(3): p. 254-262.*
116. Von Knebel Doeberitz M, S.D., Ridder R. , *Interactions between steroid hormones and viral oncogenes in the pathogenesis of cervical cancer. Review. Verth Dtsch Ges Pathol, 1997. 81: p. 233-239.*
117. Yuan F, A.K., James C. , *Altered growth and viral gene expression in human papillomavirus type-16 containing cancer cell lines treated with progesterone. . Cancer Investigation 1999a. 17: p. 19-29.*
118. An HX, Z., L, Cai GR. , *Histochemical study of estrogen and progesterone receptors in cervical carcinoma. J Tongii Med Univ, 1992. 12(1): p. 60-64.*
119. Fife KH, K.B., Roush J, Handy VD, Brown, DR, Hansell R., *Cancer-associated HPV types are selectively increased in the cervix of women in the first trimester of pregnancy. . Am J Obstet Gynecol, 1996. 174: p. 1487-1493.*
120. Fife KH, K.B., Brizendine E.J, Darron R. , *Cervical human papillomavirus deoxyribonucleic acid persists throughout pergnancy and decrease in postpartum period. . Am J Obstet Gynecol, 1999. 180: p. 1110-1114.*
121. Schiff M, M.J., Masuk M., King LA, Altobelli KK, Wheeler CM, Becker TM. , *Contraceptive and Reproductive risk factors for cervical intraepithelial neoplasia en American Indian women. International J of Epidemiology, 2000. 29: p. 983-998.*
122. Gay JD, D.L., Goellner JR., *False negative results in cervical cytologic studies. . Acta Cytol, 1985. 29(6): p. 1043-1046.*

123. Grace A, M.S., Troost M, Thornhill M, Kay E, Leader M. g. , *Comparative study: conventional cervical and ThinPrepR Pap tests in a routine clinical settin.* Cythopathology, 2002. **13**: p. 200-205.
124. Kurman RJ, S.D., *Sistema Bethesda para o relato de diagnóstico Cérvico-vaginal.* 1997, Rio de Janeiro: Revinter.
125. Cox JT, L.A., Schiffman MH, Sherman ME, Cullen A, Kurman RJ. , *Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance.* . Am J Obstet Gynecol, 1995. **172**(3): p. 946-954.
126. Mendes JC, S.L., Paredes AO. , *Lesão intra-epitelial cervical: existe correlação entre o tempo de realização do exame de Papanicolaou e o aspecto do colo uterino?* . RBAC, 2004. **36**(4): p. 191-196.
127. Lonky NM, S.M., Tsadik GW, Petitti D. T, *he clinical significance of the poor correlation of cervical dysplasia and cervical malignancy with referral cytologic results.* . Am J Obstet Gynecol, 1999. **181**(3): p. 560-566.
128. JA., K., *Vaccination as a prevention strategy for human papillomavirus-related diseases. Review.* J Adolesc Health, 2005. **37**(6 Suppl): p. S10-6.
129. SR, W. *Papilomavírus Humano.* [cited 15 de agosto de 2006].
130. Hutchinson ML, Z.D., Sherman ME, Herrero R, Alfaro M, Bratti MC, Hildesheim A, Lorincz AT, Greenberg MD, Morales J, Schiffmann M. , *Utility of liquid-based cytology for cervical carcinoma screening: results of a population-based study conducted in a region of Costa Rica with a high incidence of cervical carcinoma.* . Cancer, 1999. **87**(2): p. 48-55.

131. Nanda K, M.D., Myers ER, Bstian LA, Hasselblad V, Hickey JD., *Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review.* . Ann Intern Med, 2000. **8**: p. 10-19.
132. Jacobs TW, S.J., Schroeder B, Rasa S, Baum JK, Schnitt SJ. , *Accuracy of touch imprint cytology of Image –directed breast core needle biopsies.* . Acta Cytol, 1999. **43**: p. 169-174.
133. S., P., *False-Negative Papnicolaou smears from women with cancerous and precancerous lesions of tehe uterine cervix.* . Acta Cytol, 1991. **35**(1): p. 40-47.
134. Koss, L.G.T., *The Papanicolaou Test for cervical cancer detection: A triumph and a tragedy.* . JAMA, 1989. **261**: p. 737-743.
135. Kinney WK, M.M., Hurley LB, Ransley JE., *Where’s the High-grtade cervical neoplasia? The importance of minimally abnormal papanicolaou diagnosis.* . Obstet Gynecol, 1998. **91**: p. 973-976.
136. JB., M., *Colposcopia e Patologia Cervical*, ed. F.E. BYK. 1997, São Paulo.
137. Sherman ME, S.M., Cox JT. , *Atypical Squamous cells of undeterminad significance/Low Grade Squamous intraepithelial lesion triage study group. Effects of age and human papillomavirus viral load on colposcopy triage: data from the randomized atypical squamous cells of undeterminaded significance/Low-grade Squamous Intraeoithelial Lesion Triage Study (ALTS).* . Jnatl Cancer Inst 2002. **94**(2): p. 102-17.
138. Manos MM, K.W., Hurley LB, Sherman ME, Sieh-Ngai JMS, Kurman RJ, Ransley JE, Fettzman BJ, Hartinger JSCT, McIntosh KM, Pawlick GF, Hyatt RA. , *Identifying women with cervical neoplasia: Using Human Papillomavirus DNA testing for equivocal papnicolaou results.* JAMA, 1999. **281**(17): p. 1605-1610.

139. Cubie HA, S.A., Mc Googan E, Whitehead J, Brass A, Arends MJ, Whitley MW. , *Rapid real time PCR to distinguish between high risk human papillomavirus types 16 eand 18.* Mol Pathol, 2001. **54**(1): p. 24-29.
140. Agoff SN, L.P., Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA., *PI6INK4a Expression correlates with degree of cervical neoplasia: A comparison with Ki-67 expression and detection of High-risk HPV types.* . Mod Pathol, 2003. **16**(7): p. 665-673.
141. Cope JU, H.A., Shifmann MH, Manos MM, Lorincz AT, Burk RD, Glass AG, Greer C, Buckland J, Helgesen K, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Liaw KL. , *Comparison of the hybrid capture tube test and PCR for detection of human papillomavirus DNA in cervical specimens.* Journal of Clinical Microbiology, 1997. **35**(9): p. 2262-2265.
142. Sherman ME, S.M., Lorincz AT, Manos MM, Scott DR, Kuman RJ, Kiviat NB, Stoler M, Glass AG, Rush BB., *Toward objective quality assurance in cervical cytopathology. Correlation of cytopathologic diagnoses with detection of high-risk human papillomavirus types.* Am J Clin Pathol. , 1994. **102**(2): p. 182-187.
143. Nuovo J, M.J., Howell LP., *New tests for cervical cancer screening.* . Am Fam Physician, 2001. **64**: p. 780-786.
144. Clavel C, M.M., Putaud I. Thomas K, Bory JP, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P. , *Hybrid Capture II, a new sensitive test for a Human Papillomavirus detection-comparison with hibrid capture I and PCR results n cervical lesions.* . J Clin Pathol, 1998. **51**: p. 737-740.
145. Nuovo GJ, B.J., Margiotta M, MacConnell P, Comite S, Hochman H. , *Histological distribution of polymerase chain reaction--amplified human papillomavirus 6 and 11 DNA in penile lesions.* Am J Surg Pathol, 1992. **16**(3): p. 269-275.

146. Gravitt PE, M.M., *Polymerase chain reaction-based methods for the detection of human papillomavirus DNA*. IARC Sci Publ, 1992. **119**(121-123. ).
147. Ledger WJ, J.J., Witkin SS. , *Testing for high-risk human papillomavirus types will become a standard of clinical care. . Am J Obstet Gynecol*, 2000. **182**: p. 860-865.  
Review.
148. Schiller JT, N.-H.D., *Chapter 17: Second generation HPV vaccines to prevent cervical cancer*. Vaccine, 2006. **24S3**: p. S3/147-S3/153.
149. Hillman RJ, R.B., Botcherby M, Walker MM, Taylor-Robinson D. , *Human papillomavirus DNA in the urogenital tracts of men with genital dermatoses: evidence for multifocal infection. . Int J STD AIDS*, 1993. **4**(3): p. 147-154.
150. Mant C, K.B., Best JM, Cason J. , *Polymerase chain reaction protocols for the detection of DNA from mucosal human papillomavirus types 6, 11, 18, 31 e 33. . J Viral Methods*, 1997. **66**(2): p. 169-178.
151. Olatunbosun OA, D.H., Pierson RA. , *Human papillomavirus DNA detection in sperm using polymerase chain reaction. . Obstet Gynecol*, 2000. **95**(4 suppl): p. S56.
152. Boyd AS, A.M., Rapini RR, Adler-Storthz K, Duvic M. , *False-positive polymerase chain reaction results for human papillomavirus in lichen planus. . J Am Acad Dermatol*, 1996. **35**: p. 42-46.
153. Lo AC, F.S., *Polymerase chain reaction: Basic Concepts and clinical application in dermatology. . J Am Acad Dermatol* 1994. **30**(250-260.).
154. Mitrani-Rosenbaum S, T.R., Laviee O, Boldes R, Anteby E, Schimonovitch S, Lasarovitch T, Friedmann A. , *Simultaneous detection of three common sexually transmitted agents by polymerase chain reaction. . Am J Obstet*, 1994. **171**: p. 784-790.

155. Taha NS, F.J., Ribalta JC, Castelo A, Lorincz A, Dores GB. , *Universal Collection Medium (UCM) is as suitable as the Standard Transport Medium (STM) for Hybrid Capture II (HC-2) assay.* . J Clin Virol, 2006. **36**(1): p. 32-35.
156. Peyton CL, S.M., Lorincz AT, Hunt WC, Mielzynska I, Bratti C, Eaton S, Hildesheim A, Morera LA, Rodriguez AC, Herrero R, Sherman ME, Wheeler CM. , *Comparison of PCR-and Hybrid Capture-based human Papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies.* . J of Clinical Microbiology, 1998. **36**: p. 3248-3254.
157. Venturoli S, Z.M., La Placa Jr M, D'antuono A, Negosanti M, Gentilomi G, Gallinella G, Manaresi E, Musiani M. , *Evaluation of immunoassays for the detection and typing of PCR amplified human papillomavirus DNA.* . J Clin Pathol, 1998. **51**: p. 143-148.
158. Poljak M, B.A., Seme K, Vince A, Marin IJ. , *Comparative evaluation of First- and Second-Generation Digene Hybrid Capture Assays for detection of Human Papillomaviruses associated with high or intermediate risk for cervical cancer.* . J of Clinical Microbiology, 1999. **37**: p. 796-797.
159. Bozzetti M, N.B., Mielzinska II, Villa L, Breitenbach VV, Prolla JC. , *Comparison between hybrid capture II and polymerase reaction results among women at low risk for cervical cancer.* Ann Epidemiol, 2000. **10**(7): p. 466.
160. Schiffman M, W.C., Castle PE; A., *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study Group.* . J Infect Dis, 2002. **188**(8): p. 1169-1172.
161. Venturoli S, C.M., Bonvicini F, Giosa F, Pulvirenti FR, Galli and M.M. C, Zerbini M. , *Human papillomavirus DNA testing by PCR-ELISA and hybrid capture II from a single*

- cytological specimen: concordance and correlation with cytological results.* . J Clin Virol, 2002. **25**(2): p. 177-185.
162. Carvalho MOO, C.F., Ribeiro MO, Marinho M, Barbosa FM, Silva LE, Dimetz T, Oliveira LHS, Cavalcanti SMB., *Comparative Analysis of the Polimerase Chain Reaction and the Htbrid Capture Asay for the detection of Human Papillomavirus Infection.* DST-J.BrasDoenças Sex Transm 2004. **16**(1): p. 26-30.
163. Petignat P, F.D., Goffin F,Billieux MH, Stucki D,Sporri S, Vassilakos P. , *Age-related performance of human papillomavirus testing used as an adjunct to cytology for cervical carcinoma screening in a population with a low incidence of cervical carcinoma.* . Cancer, 2005. **105**(3): p. 126-132.
164. Meschede W, Z.K., Braspenning J, Scheffner M, Benitez-Bribiesca L, Luande J, Gissmann L, Pawlita M. , *Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer.* . J Clin Microbiol, 1998. **36**(2): p. 475-480.
165. Christensen ND, K.J., *Antibody-mediated neutralization in vivo of infectious papillomavirus.* . J Virol, 1990. **64**: p. 3151-3156.
166. Christensen ND, R.C., Cladel NM, Hall K, Leiserowitz GS. , *Monoclonal antibodies to HPV- 6 L1 virus-like particles identify conformational and linear epitopes on HPV 11 in addition to type-specific epitopes on HPV-6.* . virology, 1996. **22**: p. 477-486.
167. Alberts B, B.D., Johnson A, Lewis J, Raff M, Robeerts K, Walter P., *Controle do Ciclo Celular.*, in *Fundamentos Da Biologia Celular.* 1999, ArtMed: Porto Alegre. p. 585-604.
168. Filho AL, A.V., *Reação da Polimerização em cadeia.*, in *Lesões relacionadas à infecção pelo HPV no trato anogenital.*, M.F.A. Bibbo M, Editor. 1998, Revinter: Rio de Janeiro.

169. Koyamatsu Y, Y.M., Nakao Y, Fukuda K, Saito T, Matsukuma K, Iwasaka T. , *A comparative analysis of human papillomavirus types 16 and 18 and expressing of p53 gene and Ki-67 in cervical, vaginal, and vulvar carcinomas.* . Gynecol Oncol, 2003. **90**: p. 547-551.
170. B., L., *Ciclo Celular e regulação do crescimento.*, in *Genes VII.*, L. B., Editor. 2001, ArtMed: Porto Alegre. p. 799-836.
171. B., L., *Oncogenes e Câncer.*, in *Genes VII.*, L. B., Editor. 2001, ArtMed.: Porto Alegre. p. 837-873.
172. Coker AL, G.T., King MR, Jackson KL, Pirisi L. , *High-Risk HPVs and risk of Cervical Neoplasia: a case-control study.* . Experimental and Molecular Pathol, 2001. **70**: p. 90-95.
173. Hong MK, L.W., Herman BE, Johnston MH, Vargo JJ, Steinberg SM, Allegra CJ, Johnston PG. , *Expansion of the Ki-67 proliferative compartment correlates with degree of dysplasia in Barrett's esophagus.* . Cancer, 1995. **75**(2): p. 423-429.
174. Garzetti GG., C.A., Lucarini G., Goteri G., De Nctolis M., Muzioli M., Fabris N, Romanini C, Biagini G. , *MIB-1 immunostaining in stage I squamous cervical carcinoma: Relationship with Natural Killer Cell Activity.* Gynecol Oncol, 1995. **58**: p. 28-33.
175. Junior JE, C.D., Medeiros FC & Ferreira FVA. , *Estudo imunocitoquímico de proliferação celular (MIB-1) em sedimento de fluido peritonial na endometriose pélvica.* . RBAC, 2002. **34**(2): p. 71-73.
176. Carrilho C, G.P., Cantel M, Alberto M, Buane L, David L. , *Characterization of human papillomavirus infection, P53 and Ki-67 expression in cervix cancer of Mozambican women.* . Pathol Res Pract. , 2003. **199**(5): p. 303-311.

177. Logani S, L.D., Quint WGV, Ellenson LH, Pirog EC. , *Low-grade vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia: correlation of histologic features with human papillomavirus DNA detection and MIB-1 immunostaining.* . Modern Pathology, 2003. **16**(8): p. 735-741.
178. Mittal KR, P.J., *Cervical condylomas show higher proliferation than do inflamed or metaplastic cervical squamous intraepithelium.* Mod Pathol, 1998. **11**: p. 780-783.
179. Propiolek D, V.K., Mittal K., *Distinction of low-grade squamous intraepithelial lesions from high-grade squamous intraepithelial lesions base don quantitative analysis of proliferative activity.* . Oncology Reports, 2004. **11**: p. 687-691.
180. Frolova II, M.G., Radzinskii VE, Sheliastina NN, Babichenko II. , *Immunohistochemical examinations of dyskeratosis and exocervical neoplasia in gynecological pathology.* . Arkh Patol, 2002. **64**(6): p. 23-26.
181. Kruse AJ, G.E., Helliesen T, Janssen EA, van Diermen B, Sandvik S, Baak JP. , *Evaluation of prospective, routine application of Ki-67 immunoquantitation in early CIN for assessment of short-term progression risk.* Anal Quant Cytol Histol., 2004. **26**(3): p. 134-140.
182. Kruse AJ, S.I., Janssen EA, Buhr-Wildhagen S, Klos J, Arends MJ, Baak JP. , *Quantitative molecular parameters to identify low-risk and high-risk early CIN lesions: role of markers of proliferative activity and differentiation and Rb availability.* . Int J Gynecol Pathol, 2004. **23**(2): p. 100-109.
183. Walts AE, L.J., Bose S. , *P16 and Ki67 immunostaining is a useful adjunct in the assessment of biopsies for HPV-associated anal intraepithelial neoplasia.* Am J Surg Pathol, 2006. **30**(7): p. 795-801.

184. Hengst L, D.V., Slingerland JM, Lees E, Reed SI. , *A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases.* . Proc Natl Acad Sci USA, 1994. **91**: p. 5291-5295.
185. Zaragoza, O.P.R., M.B.; Benítez, C.E.D. & Marina, V.M. , *Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapêuticas.* . Salud Publica Mex, 1997. **39**: p. 451-462.
186. Tycko B, A.J., *Epigenetics and its role in disease.* J Clin Invest, 2000. **105**(3): p. 245-246.
187. Tierney Jr LM, M.P.S.M.A.P., Ralph Gonzales, Roni Ziegler. *Tumour Supressor Genes.* Current medical Diagnosis & Treatment [cited 2006 junho 2006].
188. Mc Donald ERIII, E.-D.W., *Checkpointes gene in cancer.* . Annals of Medicine., 2001. **33**(2): p. 113-122.
189. Hahn WC, W.R., *Mechanisms of Disease: Rules for making human tumor cells.* . The New England Journal of Medicine 2002. **347**(20): p. 1593-1603.
190. Böttger A, B.V., Sparks A, Liu WL, Howard SF, Lane DP. , *Design of a synthetic Mdm2-binding mini protein that activates the p53 response in vivo.* Curr Biol 1997. **7**(11): p. 860-869.
191. MA., D., *A review of the natural history of cervical intraepithelial neoplasia.* . GanTo Kagaku Ryoho, 2002. **29**(suppl 1): p. 176-193.
192. Jeannon JP , W.J., *Cyclins, cyclin-dependent kinases, cyclin-dependent kinases inhibitors and their role in head and neck cancer.* . Clinicl Otolaryngology 1998. **23**(5): p. 420-424.
193. Stewart ZA, W.M., Pietenpol JA. , *Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy.* . Trend Pharmacol Sci, 2003. **24**(3): p. 139-145. Review.

194. Nakashima R, F.M., Enomoto T, Haba T, Yoshino K, Wada H, Kurachi H, Sasaki M, Wakasa K, Inoue M, Buzard G, Murata Y. , *Alteration of p16 and p15 genes in human uterine tumours.* . British Journal of Cancer, 1999. **80**(3/4): p. 478-467.
195. Cho NH, K.Y., Kim JW. , *Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus: cyclin-dependent kinase inhibitors. Review.* Yonsei Med J, 2002. **43**(6): p. 422-428. Review.
196. Tsai JH, P.Y., Lin LY, Chou MC, Lee H, Chiou HL., *An association between human papillomavirus 16/18 deoxyribonucleic acid in peripheral blood with p16 protein expression in neoplastic cervical lesions.* . Cancer Detection and Prevention 2005. **29**: p. 537-543.
197. Kang S, K.J., Kang GH, Park NH, Song YS, Kang SB, Lee HP. , *Polymorphism in folate- and methionine-metabolizing enzyme and aberrant CpG island hypermethylation in uterine cervical cancer.* . Gynecol Oncol, 2005. **96**(1): p. 173-80.
198. Klaes R, F.T., Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. , *Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri.* Int J Cancer, 2001. **92**(2): p. 276-284.
199. Ortega S, M.M., Barbacid M. , *Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer.* . Biochim Biophys Acta, 2002. **1602**(1): p. 73-87. Review.
200. Malanchi I, C.S., Krützfeldt M, Giarre M, Alunni-Fabbroni A, Tommasino M. , *Identification of a novel activity of human papillomavirus type 16 E6 protein in desregulating the G1/S transition.* Oncogene, 2002. **21**: p. 5665-5672.

201. Klaes R, B.A., Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, Kurman RJ, Schmidt D, Stoler M, von Knebel Doeberitz M. , *p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia*. Am J Surg Pathol, 2002. **26**(11): p. 1389-1399.
202. Masumoto N, F.T., Ishikawa M, Saito M, Iwata T, Fukuchi T, Susumu N, Mukai M, Kubushiro K, Tsukazaki K, Nozawa S. P, *P16 overexpression and human papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix*. Hum Pathol, 2003. **34**(8): p. 778-783.
203. Van de Putte G, K.G., Lie AK, Baekelandt M, Holm R. , *Cyclins and proliferation markers in early squamous cervical carcinoma*. . Gynecol Oncol, 2004. **92**(1): p. 40-46.
204. Lorenzato M, C.S., Bronner C, Evrard G, Simon M, Durlach A, Birembaut P, Clavel C. , *Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions?* . Hum Pathol, 2005. **36**(10): p. 1101-1107.
205. Nobori T, M.K., Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson D. , *Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers*. . Nature, 1994. **368**: p. 753-756.
206. Lukas J, P.D., Aagard L, Mann DJ, Bartkova J, Strauss M, Peters G, Bartek J. R, *Retinoblastoma-protein-dependent cell cycle inhibition by the tumour suppressor p16*. Nature, 1995. **375**: p. 503-510.
207. Kleif SN, D.G.J., Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR, Howley PM. , *Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity*. . Proc Natl Acad Sci USA, 1996. **93**: p. 4350-4354.

208. Sano T, O.T., Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T., *Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions.* . Am J Pathol, 1998. **153**(6): p. 1741-1748.
209. Munirajan A.K.; Kannam, K.B., V.; Ishida, I.; Fujinara,K.; Tsuchida,N. & Shanmugam,G., *The status of human papillomavirus and tumor suppressor genes p53 and p16 in carcinomas of uterine cervix from India.* India Gynecol Oncol, 1998. **169**(3): p. 205-209.
210. Wong YF, C.T., Cheung TH, Nobori T, Yu AL, Yu J, Batova A, Lai KWH, Chang AMZ. , *Methylation of p16INK4A in primary gynecologic malignancy.* . Cancer Letters, 1999. **136**: p. 231-235.
211. Park JS, D.S., Kim SH, Lee JY, Um SJ, Park IS, Kim SJ, Namkoong SE. , *Detection of p16 gene alteration in cervical cancer using tissue microdissection and LOH study.* . Cancer Letters 1999. **136**: p. 101-8.
212. Virmani AK, M.C., Rathi A, Zoechbauer- Mueller S, Mathis M, Gazdar AE. , *Aberrant methylation during cervical carcinogenesis.* Clin Cancer Res. , 2001. **Mar;7**(3): p. 584-9.
213. Yang HJ, L.V., Wang Y, Chan KYK, Tsang PCK, Khoo US, Cheung ANY, Ngan HYS., *Detection of hypermethylation in tumor and plasma of cervical cancer patients.* Gynecol Oncol, 2004. **93**: p. 435-440.
214. Kim JW, N.S., Ryu SW, Kim HS, Shin JW, Lee JM, Kim DH, Kim K. , *Absence of p15INK4B and p16INK4A gene alterations in primary cervical carcinoma tissues and cell lines with Human Papillomavirus infection.* . Gynecologic Oncology, 1998. **70**: p. 75-79.
215. Dong SM, K.H., Rha SH, Sidransky D. , *Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix.* Clin Cancer Res, 2001. **Jul;7**(7): p. 1982-6.

216. Klies R, B.A., Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, Kurman RJ, Schmidt D, Stoler M, von Knebel Doeberitz M. , *p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia*. . Am J Surg Pathol., 2002. **26**(11): p. 1389-1399.
217. Bibbo M, K.W., De Cecco J, Kovatich AJ., *Procedure for immunocytochemical detection of P16INK4A antigen in thin-layer, liquid-based specimens*. Acta Cytol, 2002. **46**(1): p. 25-29.
218. Yoshida T, F.T., Sano T, Kanuma T, Owada N, Nakajima T. , *Usefulness of liquid-based cytology specimens for the immunocytochemical study of p16 expression and human papillomavirus testing: a comparative study using simultaneously sampled histology materials*. . Cancer, 2004. **102**(2): p. 100-108.
219. Nieh S, Y.S., Chu TY, Lai HC, Lin YS, FU E, Gau CH.. *Is p16(INK4A) 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 biopsie*. Gynecol Oncol, 2005. **97**(1): p. 35-40.
220. Kalof AN, C.K., *p16INK4a immunoexpression: surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia*. . Adv Anat Pathol., 2006. **13**(4): p. 190-194. Review.
221. O'Neill CJ, M.C.W., *p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis*. Adv Anat Pathol., 2006. **13**(1): p. 8-15. Review.
222. Sahebali S, D.C., Boulet GA, Arbyn M, Moeneclaey LM, Vereecken AJ, Van Marck EA, Bogers JJ. , *Immunocytochemistry in liquid-based cervical cytology: analysis of clinical use following a cross-sectional study*. . Int J Cancer, 2006. **118**(5): p. 1254-1260.

223. Benevolo M, M.M., Marandino F, Vocaturo G, Sindico R, Piperno G, Mariani L, Sperduti I, Canalini P, Donnorso RP, Vocaturo A. , *Immunohistochemical expression of p16(INK4a) is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions.* . Mod Pathol, 2006. **19**(3): p. 384-391.
224. Astbury K, M.C., Ring M, Pilkington L, Bolger N, Scheils OM, O'Leary JJ., *Future Molecular aspects of cervical cytology.* Curr Diagn Pathol, 2006. **12**: p. 104-113.
225. Emig R, M.A., Ehemann V, Meyer A, Stilgenbauer F, Volkmann M, Wallwiener D, Sinn HP. , *Aberrant cytoplasmic expression of the p16 protein in breast cancer is associated with accelerated tumour proliferation.* . Br J Cancer, 1998. **78**(12): p. 1661-1668.
226. Milde-Langosch K, B.A., Rieck G, Kelp B, Loning T. O and B.C.R.T.M. 67(1):61-70., *overexpression of the p16 cell cycle inhibitor in breast cancer is associated with a more malignant phenotype.* Breast Cancer Res Treat., 2001. **67**(1): p. 61-67.
227. Jung SM, L.H., Chu PH, Wu HH, Shiu TF, Huang SL, Lai CH. , *Expression of cell cycle-regulatory proteins, MIB-1, p16, p53, and p63, in squamous cell carcinoma of conjunctiva: not associated with human papillomavirus infection.* Virchows Arch, 2006. **448**(3): p. 301-305.
228. Guimaraes MC, G.M., Soares CP, Bettini JS, Duarte RA, Soares EG. , *Immunohistochemical expression of p16INK4a and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions.* . J Histochem Cytochem. , 2005. **53**(4): p. 509-516.
229. Queiroz C, S.T., Alves VA, Villa LL, Costa MC, Travassos AG, Filho JB, Studart E, Cheto T, de Freitas LA. , *Comparative study of the expression of cellular cycle proteins in cervical intraepithelial lesions.* . Pathol Res Pract, 2006. **202**(10): p. 731-737.

230. Roden R, W.T., *How will HPV vaccine affect cervical cancer?* Nature Reviews, 2006. **6**: p. 753-763.
231. Mandic A, V.T., *Human papillomavirus vaccine as a new way of preventing cervical cancer: a dream or the future? Review.* Ann Oncol, 2004. **15**(2): p. 197-200. .
232. Lollini PL, C.F., Nanni P, Forni G., *Vaccines for tumour prevention.* Nat Rev Cancer. , 2006. **6**(3): p. 204-16.
233. Giles M, G.S., *A study of women's knowledge regarding human papillomavirus infection, cervical cancer and human papillomavirus vaccines.* Aust N Z J Obstet Gynaecol., 2006. **46**(4): p. 311-315.
234. JA, F., *Prevention of cervical cancer trough papillomavirus vaccination* Nat Rev Immunol, 2004. **4**: p. 46-54.
235. Giles M, G.S., *Human papillomavirus infection: an old disease, a new vaccine.* Aust N Z J Obstet Gynaecol. , 2006. **46**(3): p. 180-185.
236. I., F., *Vaccine for papillomavirus infection.* Virus Research, 2002. **89**: p. 271-274.
237. Inglis S, S.A., Koenig S., *Chapter 11: HPV vaccines: Commercial Research & Development.* Vaccine, 2006. **24S3**: p. S3/99-S3/105.
238. Collussi., C. (2006) *Folha on line.* . **Volume,** DOI: [www2.uol.jornaldecampos/681/hpv.htm](http://www2.uol.jornaldecampos/681/hpv.htm)).

1. N, V., *Editorial*. Revista Brasileira de Sexualidade Feminina, 1998. **9**(2): p. 139.
2. Pater A, B.M., Pater M, *Oncogenic transformation by Human Papillomavirus type 16 deoxyribonucleic acid in the presence of progesterone or progestins from oral contraceptives*. Am J Obstetr Gynecol, 1990. **162**: p. 1099-103.
3. M.K., D., *New Markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomaviruses infections*. Eur J Cancer, 2002. **38**: p. 2229-2242.
4. Horng JT, K.K., Wu, LC, Huang HD, Lin FM, Huang SL, Lai HGC, Chu TY. , *Identifying the combination of genetic factors that determine susceptibility to cervical cancer*. IEEE Trans Inf Technol Biomed 2004. **8**(1): p. 59-66.
5. Lambert APF, A.F., Schmitt VM. , *P16INK4A expression in cervical premalignant and malignam lesions*. . Experimental and Molecular Pathology 2006. **80**: p. 192-196.
6. Tjalma WA, A.M., Paavonem J, Waes TR, Bogers JJ. , *Prophylactic human papillomavirus vaccines: the beginning of the end of cervical cancer*. . Int J Gynecol Câncer 2004. **14**: p. 751-761.
7. Duarte-Franco E, F.E., *Other Gynecologic Cancers: endometrial, ovarian, vulvar and vaginal cancers*. . BMC Womens Health 2004. **25(4 Suppl 1)**: p. S14.
8. Câncer, I.N.d. *Estimativa 2006. Incidência de Câncer no Brasil*. 2006 [cited 10 de Dezembro de 2006].
9. Hartmann KE, N.K., Hall S, Myers E., *Screening for Cervical Cancer – Agency for Healthcare Research and Quality*. 2002.
10. LA, P., *Genital HPV: Links to cervical cancer, treatment, and prevention*. Clin Lab Sci 2001. **14**(3): p. 183-6.; quiz 193.

11. Burchell AN, W.R., de Sanjosé S, Franco EL., *Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection*. Vaccine, 2006. **24S3**: p. S3/52-S361.
12. Veljkovic M, K.V., Popovic J. , *Effects of oral contraception on carcinogenesis*. Facta Universitatis, 2004. **11**(1): p. 11-15.
13. Kanao H, E.T., Ueda Y, Fujita M, Nakashima R, Ueno Y, Miyatake T, Yoshizaki T, Buzard GS, Kimura T, Yoshino K, Murata Y. , *Correlation between p14ARF/p16INK4A expression and HPV infection in uterine cervical cancer*. Cancer Letters, 2004. **213**: p. 31-37.
14. Ishikawa M, F.T., Saito M, Nindi I, Ono A, Kubushiro K, Tsukazaki K, Mukai M, Nozawa S., *Overexpression of p16INK4a as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia*. Int J Gynecol Cancer 2006. **16**: p. 347-353.
15. Schneede, P., *Genital human papillomavirus infections*. . Curr Opinion in Urology 2002. **12**: p. 57-61.
16. N., M., *Human Papillomavirus and cancer: The epidemiological evidence*. J. of Clin Virol, 2000. **19**: p. 1-5.
17. Medeiros LR, d.M.E.A., Hilgert JB, Zanini RR, da Silva OB, Bozzetti MC, Mylius LC. , *Vertical transmission of the Human Papillomavirus: a systematic quantitative review* Cad. Saúde Pública 2005. **21**(4): p. 106-1015.
18. Munoz N, C.X., de Gonzalez AB, Gissman L., *Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer*. Vaccine, 2006. **21**(24S3): p. S1-S10.

19. Ferrera A, V.J., Fihueroa M, Toro LA, Claros JM, Barahona O, Melchers WJG. , *Co-factors related to the causal relationship between Human Papillomavirus and invasive cervical cancer in Honduras.* . International Journal of Epidemiology 2000. **29**: p. 817-25.
20. Juneja A, S.A., Mitra AB, Pandey A. , *A Survey on a risk factors Associated with cervical Câncer.* . Indian J of Cancer, 2003. **40**: p. 15-22.
21. Harper DM, L.M., Noll WW, Belloni DR, Cole BF. , *Factors affecting the detection rate of Human Papillomavirus.* Ann Fam Med 2003. **1**: p. 221-227.
22. Agorastos T, D.K., Lioveras B, de Sanjose S, Kornegay JR, Bonti H, Nosch FX, Constantinidis T, Bontis J. , *Human papillomavirus testing for primary screening in women at low risk of developing cervical cancer.* . Ginecologic Oncology, 2005. **96**: p. 724-730.
23. Rousseau M, F.E., Villa LL, Sobrinho JP, Termini L, Prado JM. & Roban TE, *A cumulative case-control study of risk factor profiles for oncogenic and non-oncogenic cervical Human papillomavirus infection.* . Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 2000. **9**: p. 469-476.
24. Jacobs MV, S.P., Voorhorst FJ, Dillner J, Forslund O, Johansson B, von Knebel Doeberitz M, Meijer CJ, Meyer T, Nindl I, Pfister H, Stockfleth E, Strand A, Wadell G, Walboomers JM., *Reliable high risk HPV DNA testing by polimerase chain reaction: an intermethod and intramethod comparison.* J.Clin. Pathol. , 1999. **52**: p. 498-503.
25. Behtash N, M.N., *Cervical Cancer: Screening and prevention.* . Asian Pac J Cancer Prev 2006. **7**(4): p. 683-686.
26. Murphy N, R.M., Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F, Turner M, McGuinness E, Griffin M, Martin C, Sheils O, O'Leary JJ, *P16INK4A as a marker for*

- cervical dyskariosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and Thin Prep TM smears.* . J Clin Pathol, 2003. **56**: p. 56-63.
27. Kijima H, U.Y., Osamura Y. , *Histopathology and tumor markers. Review.* Rinsho Byori., 2003. **51**(12): p. 1203-1215.
28. Svare EL, K.H., Poll P, Tjong-A-Hung SP, Sschegger J. Risk factors for HPV Detection in Archival Pap smears. , *A population-based study from Greenland and Denmark.* . Eur J Cancer 1998. **34**(8): p. 1230-1234.
29. Kaufman RH, A.E., Icenogle J, Reeves W. , *Human papillomavirus testing as triage for atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesions: Sensitivity, specificity, and cost-effectiveness.* AmJ Obstet Gynecol 1997. **177**: p. 930-936.
30. Bibbo M, M.e.S.F., A., *Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital.* 1998, Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter.
31. IH., F., *HPV Vaccines.* Int J Gynecol Obstetr, 2006. **94**(suppl 1): p. S81-S88.
32. Munoz N, M.F., Passo H, Molano M, van de Brule AJ, Ronderos M, Munoz A., *Instituto Nacional de Cancerología, Incidence, duration and determinants of cervical human papillomavirus infection in an cohort of Colombian women with normal cytological results.* . J Infect Dis, 2004. **12**(190): p. 2077-2087.
33. EM., B., *Human Papillomavirus and cervical Cancer.* . Clinical Microbiology Reviews 2003. **16**: p. 1-17.
34. Alani RM, M.K., *Human Papillomaviruses.* Science & Medicine 1998. **May-Jun**(28-35.).

35. Chan W, K.G., Bernard H. . and *Progesterone and Glucocorticoid response elements occur in the long control region of several Human Pappilomaviruses involved in anogenital neoplasia.* . J. Virol., 1989. **32**: p. 61-69.
36. Moodley M, M.J., Chetty R, Herrington CS. , *The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: a review.* . Int J Gynecol Cancer., 2003. **13**(2): p. 103-110.
37. Park RB, A.E., *Genetic analysis of High-risk in episomal maintenance of human papilloomavirus genomes in primary human keratinocytes.* . J. Virol., 2002. **76**: p. 11359-64.
38. Webster K, T.A., Gaston K. J Gen Virol 2001; 82:201-213. . *Oestrogen and progesterone increase the levels of apoptosis induced by human papillomavirus type 16 E2 e E7 proteins.* J Gen Virol, 2001(82): p. 201-213.
39. M., S., *Prognostic factors and new therapeutic approaches to cervical cancer.* Virus Research, 2006. **89**: p. 241-248.
40. LL., V., *Human Papillomavirus and Cervical Cancer.* Adv in Cancer Reserch, 1997. **71**: p. 321-341.
41. Tsuda H, H.Y., Nishimura S, Kawamura N, Inoue T, Yamamoto K. , *Relationship between HPV typing abnormality og G1 cell cycle regulators in cervical neoplasia.* . Gynecologic Oncology, 2003. **91**: p. 476-485.
42. Nishimura A, O.T., Ishimoto A, Dowhanick JJ, Frizzel AA, Howley PM, Sakai H. J Virol *Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition.* . J Virol., 2000. **74**(8): p. 3752-60.

43. Bosch FX, S.S.d., *Human Papillomavirus in Cervical cancer*. Curr Oncol Research 2002. **4**: p. 175-183.
44. Finzer P, A.-L.A., Rosl F. , *The Role of Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 apoptosis*. Cancer Letters, 2002. **188**: p. 13-24.
45. Ferenczy A, J.A., *Tissue effects and host response. The key to the rational triage of cervical neoplasia*. . Obstet Gynecol Clin North Am, 1996. **23**: p. 759-782.
46. Keating JT, I.T., Crum CP. , *Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis*. Adv.Anat. Pathol 2001. **8**: p. 83-92.
47. EJ., A., *Verrugas*, in *Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infeciosas.*, E.N. Schachter M, Eisenstein BI, Medoff G., Editor. 2002, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. p. 332-337.
48. Rivoire W, C.E., Monego HI, Appel M, Reis R., *Lesões de Baixo e Alto grau no colo uterino.*, in *Rotinas em Ginecologia.*, M.C. Freitas F, Rivoire W, Passos EP., Editor. 2001, ArtMed: Porto Alegre. p. 261-272.
49. Duensing S, D.A., Crum C. & Münger K. , *Human Papillomavirus type16 E7 oncoprotein-induced abnormalcentrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype*. . Cancer Research 2001. **61**: p. 2356-2360.
50. Kruse AJ, B.J., Helliesen T, Kjellevoid KH, Robboy SJ. , *Prognostic value and reproducibility of koilocytosis in cervical intraepithelial neoplasia*. Int J Gynecol Pathol. , 2003. **22**(3): p. 236-239.
51. Roteli-Martins C, A.V., Santos TM, Martinez EZ, Syrjanen KJ, Derchain SFM. , *Value of morphological criteria in diagnosing cervical HPV lesions confirmed by In situ hybridization and Hybrid capture assay*. Pathol Res Pract, 2001. **197**: p. 677-682.

52. Boon ME, B.L., de Bosschere MJ, Verbruggen BS, Kok LP, *Koilocytosis and squamous (pre)neoplasia as detected in population-based cervical screening: practice and theory*. Eur J Gynaecol Oncol 2005. **26**(5): p. 533-6.
53. Rochanawutanon M, S.S., *The histopathologic patterns of cervical lesions and visual inspection with acetic acid on excised uterine cervixes*. Int J Gynecol Cancer, 2007. **14**.
54. Herrington CS, E.M., Charnock FM, Gray W, Mc Gee JOD. , *HPV testing in patients with low grade cervical cytological abnormalities: a follow up study*. J Clin Pathol 1996. **49**: p. 493-496.
55. Coker AL, S.M., Fadden MK, Pirisi L. , *Intimate partner violence and cervical neoplasia*. J Womens Health Gend Based Méd 2000. **9**(9): p. 1015-1023.
56. Villa LL, S.L., Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL. 81, *Molecular variants of Human Papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia*. J.Gen Virol., 2000. (Pt 12): p. 2959-2968.
57. Yokoyama M, I.T., Nagata C, Nozawa S, Sekiya S, Hirai Y, Kanasawa K, Sato S, Hoshiai H, Sugars M, Kawana T, Yoshikawa H., *Prognostic factors associated with the clinical outcome cervical intraepithelial neoplasia: a cohort study in Japan*. Cancer Letters, 2003. **192**: p. 171-179.
58. Silins I, W.X., Tadesse A, Jansen KU, Schiller JT, Avall-Lundqvist E, Frankendall B, Dillner. , *A population-based study of cervical carcinoma and HPV in Latvia*. J. Gynecologic Oncology, 2004. **93**: p. 484-492.
59. Munoz N, F.S., Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX, *International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study*

- Group. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. . Lancet, 2002. 359(9312): p. 1093-1101.*
60. Hildesheim A, L.A., Greenberg, MD, Morales J, Shiffman M. , *Utility of liquid-based cytology for cervical carcinoma screening: results of a population-based study conducted in a region of Costa Rica with a high incidence of cervical carcinoma.* Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 1994. **87(2)**: p. 48-55.
  61. ME., H., *Infection with Human Papillomavirus: Update on epidemiology, diagnosis and treatment. . Cur Infectious Dis Reports, 2000. 2: p. 18-24.*
  62. Richardson H, K.G., Tellier P, Voyer H, Abrahamowicz M, Ferenczy A, Coutlee F, Franco EL. , *The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2003. **12(6)**: p. 485-490.
  63. Schlecht NF, P.R., Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JCM, Ferenczy A, Rohan TE, Villa LL, Franco EL. , *Human Papillomavirus and time to progression and regression of Cervical Intraepithelial neoplasia. . J Natl Cancer Inst, 2003. 95: p. 1336-1343.*
  64. Sellors JW, K.T., Kaczorowski J, Mahony JB, Lytwyn A, Chong S, Sparrow J.& Lorincz A. , *Incidence clearance and predictors of human papillomavirus infection in women.* CMAJ, 2003. **168**: p. 421-425.
  65. Noronha V, M.W., Villa L, Brito A, Macedo R, Bisi F, Mota R, Sassamoto K, Monteiro T, Linhares A. , *Papilomavírus humano associado a lesões de cérvix uterina.* Rev Soc Bras Med Tropical 1999. **32**: p. 235-240.

66. Murta EFC, S.M.d., Araújo Junior E, Adad AJ. , *Incidence of Gardnerella vaginalis, Cândida sp and Human papillomavirus in cytological smears.* . São Paulo Med J/Rev Paul Med, 2000. **118**(4): p. 105-108.
67. Lorenzato F, H.L., Terry G, Singers A, Santos LC, De Lucena Batista R, Lubanbo T. 2000; 10: 143-150. and *The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife ( Brazil).* Int J Gynecol Cancer, 2000. **10**: p. 143-150.
68. Becker E, E.M., Nonnenmacker B, Bozzetti M.C. , *Prevalence and epidemiologic correlates of atypical squamous cells of undetermined significance in womwn at low risk for cervical cancer.* . Diagn Cytopathol 2001. **24**(4): p. 276-282.
69. Nonnemacher B, P.J., Bozzetti ,MC, Mielzinska-Lohnas I, Lorincz AT, Ikuta N, Schwartzmasn G, Villa L, Schiller JT, Franco E. , *Epidemiologic correlates of antibody response to human papillomavirusamongn womwn at low risk of cervical cancer.* Int J SDT & AIDS 2002. **13**(D639): p. 1-8.
70. Longatto Filho A, U.M., Shirata NK, Pereira SMM, Namiyama GM, Kanamura CT, Santos G da C, de Oliveira MA, Wakamatsu A, Nonogaki S, Roteli-Martins C, di Loreto C, de Castro Ferraz MGM , Maeda MY, Alves VAF,Syrjanen K., *Immunocytochemical expression of p16INK4A and Ki-67 in cytologically negative and equivocal pap smears positive for oncogenic human papillomavirus.* Int J Gynecol Pathol, 2005. **24**(2): p. 118-124.
71. Pinto AP, T.S., Cruz OR. , *Co-Fatores do HPV na oncogênese cervical.* Rev Assoc Med Brás, 2002. **48**(1): p. 73-78.
72. Pereyra EAG, P.C., *Entendendo Melhor a Infecção pelo Papilomavírus Humano.* Shering, in ARTSMED. 2003: São Paulo.

73. Villa LL, F.E., *Epidemiologic Correlates of Cervical Neoplasia and risk of Human Papillomavirus infection in asymptomatic women in Brazil*. J of the Natl Cancer Inst, 1989. **81**: p. 332-340.
74. Boyle DCM, S.J., *Infection and cervical intraepithelial neoplasia*. Int J Gynecol Cancer, 1999. **9**: p. 177-186.
75. S., T., *Major avoidable risk factors of cancer*. Cancer Letters, 1999. **143(suppl)**: p. S19-S23.
76. Castellsagué X, B.F., Muñoz N. 2002; 89:191-199. and *Enviromental co-factors in HPV carcinogenesis*. Virus Research, 2002. **89**: p. 191-199.
77. Frega A, S.P., De Ioris A, Piazzè JJ, Fambrini M, Marchionni M, Cosmi EV. , *Young women, cervical intraepithelial neoplasia and Human papillomavirus: risk factors for persistence and recurrence*. Cancer Letters, 2003. **196(2)**: p. 127-134.
78. Snowwhite IV, J.W., Dumestre J, Dunlap K, Hagensee ME. , *Comparative analysis of methods for collection and measurement of cytokines and immunoglobulins in cervical and vaginal secretions of HIV and HPV infected women*. Journal of Immunological Methods 2002. **263**: p. 85-95.
79. White WI, W.S., Bonnez W, Rose RC, Koenig S, Suzich JA., *In vitro infection and type-restricted antibody-mediated neutralization of authentic Human Papillomavirus type 16*. . Journal of virology 1998. **72**: p. 959-964.
80. Passmore JA, M.M., Denny L, Sampson C, Marais DJ, Allan B, Gumbi PP, Hitzeroth II, Rybicki EP, Williamson AL. , *Comparison of cervical and blood T-cell responses to human papillomavirus-16 in women with human papillomavirus-associated cervical intraepithelial neoplasia*. Immunology. , 2006. **119(4)**: p. 507-514.

81. Nimako M, F.A., Wilkinson GWG, Borysiewicz LK, Man S. , *Human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III* . Cancer Research 1997. **57**: p. 4855-4861.
82. Bontkes HJ, D.G.T., Walboomers JM, Schiller JT, Dillner J, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Scheper RJ, Meijer CJ., *Immune response against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia.II. Systemic but not local IgA responses correlate with clearance of HPV 16*. Journal of General Virology 1999. **80**: p. 409-417.
83. De Gruijl TD, B.H., Walboomers JMM, Coursaget P, Stukart MJ, Dupuy C, Kueter E, Verheijen RHM, Helmerhorst TJM, Duggan-Keen MF, Stern PL, Meijer CJLM, Scheper RJ. , *Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. I. Differential T-helper and IgG responses in relation to HPV infection and disease outcome*. Journal of General Virology 1999. **80**: p. 399-408.
84. Mota F, R.N., Chong S, Singer A, Chain B *The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium*. Immunology, 1999. **116**: p. 33-40.
85. Crowley-Nowick PA, E.J., Vermund SH, Douglas SD, Holland CA, Moscicki AB. , *Cytokine profile in genital tract secretions from female adolescents: Impact of human immunodeficiency virus, human papillomavirus , and other sexually transmitted pathogens*. . J Infect Dis, 2000. **181**: p. 939-945.

86. El-Sherif AM, S.R., Tighe PJ, Jenkins D. , *Quantitative analysis of IL-10 and IFN- $\gamma$  mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical pre-cancer.* . J Pathol, 2001. **195**: p. 179-185.
87. L, B., *Interactions of the female hormonal environment, susceptibility to viral infections, and disease progression.* Aids Patient Care and STDs, 2002. **16**(5): p. 211-221.
88. Wallin KL, W.F., Luostarinen T, Angström T, Antilla T, Bergmann F, Hallmans G, Ikaeimo I, Koskela P, Lehtinen M, Stendahl P, Paavonen J, Dillner J. , *A population-based prospective study of Chlamydia trachomatis infection and cervical carcinoma.* . Int.J.Cancer, 2002. **101**: p. 371-374.
89. Dillner J, L.P., Lehtinen M, Eklund C, Heino P, Wiklund F, Hallmans G, Stendhal A. , *A population-based seroepidemiological study of cervical cancer.* . Cancer Research, 1994. **54**: p. 134-141.
90. Koskela, P., Antilla T, Bjorge T, Brunsvig A, Dillner J, Hakama M, Hakulinen T, Jellun E, Lehtinen M, Lenner P, Luostarinen T, Pukkala E. et al. Int J Cancer 2000; 85(1):35-39. , *Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer.* Int J Cancer, 2000. **85**(1): p. 35-39.
91. Antilla T, S.P., Koskella P, Bloigu A, Dillner J, Ikaheimo I, Jelum E, Lehtinen M, Lenner P, Hakulinen T, Narvanen A, Pukkala E, Thoresen S, Youngman L, Paavonen J. et al., *Serotypes of Chlamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma.* . JAMA, 2001. **285**: p. 47-51.
92. Harris TG, K.S., Kiviat NB, Mao C, Agott SN, Feng Q, Koutsky LA . 2004; 159(9):834-42., *Cigarette smoking, oncogenic human papillomavirus, Ki67 antigen, and cervical intraepithelial neoplasia.* Am J Epidemiol 2004. **159**(9): p. 834-842.

93. Atalah ES, U.C., Rebolledo AA, Villegas RA, Medina EL, Csendes AJ. Rev Méd Chile 2001; 129: 597-603., *Alimentación, tabaquismo e historia reproductiva como factores de riesgo Del cáncer de cuello Del útero*. Rev Méd Chile, 2001. **129**: p. 597-603.
94. Moore TO, M.A., Carrasco D, Vander Straten M, Arany I, Au W, Tyring SK. , *Human Papillomavirus, smokimng and cancer*. J Cutan Med Surg, 2001. **5**(4): p. 323-328.
95. Nunez JT, D.M., Pino G, Giron H, Bolet B. , *Smoking as a risk factor for preinvasive and invasive cervical lesions in female sex workers in Venezuela*. . Int J Gynecol Obstet, 2002. **79**(1): p. 57-60.
96. Coker AL, B.S., Wlliams A, Gerasimova T, Pirisi L. 2002; 26: 121-128. and *Active and passive smoking, high-risk human papillomavirus and cervical neoplasia*. Cancer Detection and Prevention 2002. **26**: p. 121-128.
97. Wyatt SW, L.M., Bottorf D, Ross, F. , *History of tobacco use among Kentucky Women diagnosed with invasive cervical cancer:1997-1998*. Journal of the Kentucky Medical Association 2001. **99**: p. 537-539.
98. Ho GYF, B.R., Beardsley L, Chang, CJ, Burk RD. , *Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women*. N Engl J Med 1998. **338**: p. 423-428.
99. Lacey JV, B.L., Barnes WA, Gravitt PE, Greenberg MD, Hadjimichael OC, Mc Gowan L, Mortel R, Schwartz PE, Kurman RJ, Hildesheim A. , *Use of hormone replacemete therapy and denocarcinomas and squamous cell carcinomas of the uterine cervix*. . Gynecologic Oncology, 2000. **77**: p. 149-154.
100. Lea JS, C.R., Kurien A, Schorge JO, Miller DS, Minna JD, Muller CY. , *Aberrant p16 methylation is a biomarker for tobacco exposure in cervical squamous cell carcinogenesis*. . Am J Obstet Gynecol 2004. **190**(3): p. 674-679.

101. Murta EFC, d.S.M., Adad SJ, Junior EA. , *Infecção pelo Papilomavírus Humano em adolescentes: Relação com o método anticoncepcional, gravidez, fumo e achados citológicos.* . RBGO, 2001. **23**(4): p. 217-221.
102. Michelin D, G.L., Street D, Potkul RK, Fisher S, Kaufmann AM, Qiao L, Schreckenberger, C. , *Regulation of Human papillomavirus type 18 in vivo: Effects of estrgen and progesterone in transgenic mice.* Gynecol Oncol 1997. **66**: p. 202-208.
103. Ferenczy A, M.M., Mansour N. , *Human Papillomavirus infection in postmenopausal womwn with and without hormone therapy.* Obstet Gynecol, 1997. **90**: p. 7-11.
104. Herrero R, C.P., Schiffmann M., Bratti MC, Hildesheim A., Morales J., Alfaro M, Sherman ME, Walcholder S, Chen S, Rodrigues AC, & Burk RD. , *Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica.* . J Infect Dis, 2005. **191**(11): p. 1796-1807.
105. Brenteni MM, F.J., *Receptores Esteroidicos in Ginecología Endocrina.* 1995: Ed Atheneu.
106. Hildesheim A, R.W., Brinton LA, Lavery C, Brenes M, De La Guardia ME, Godoy J, Rawls WE. , *Association of oral contraceptive uise and human Papillomaviruses in invasive cervical cancer.* Int J Cancer, 1990. **45**(5): p. 860-864.
107. Herrero R, B.L., Reeves WC, Brenes MM, Britton RC de, Tenorio F, Gaitan E. , *Injectable contraceptives and risk of invasive cervical cancer: evidence of an association.* . Int J Cancer, 1990. **46**(1): p. 5-7.
108. Harper JM, L.A., Rosenthal DL, Wiesmeier E, Hunt IF, Swendseid ME, Haile RW. , *Erytrocite folate levels, oral contraceptive use and abnormal cervical cytology.* . Acta Cytol, 1994. **38**(3): p. 324.

109. Kjeldsberg L, H.G., Ahren AM, Johansson R, Bergman F, Wadell G, Angstrom T, Dillner J. , *Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as a risk factors for cervical intra-epitelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection*. Br J Cancer, 2000. **82**(7): p. 1332-1338.
110. Moreno V, B.F., Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, Herrero R, Franceschi S., *International Agency for Research on Cancer Multicentric Cervical Cancer Study Group. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study*. Lancet, 2002. **359**(9312): p. 1085-1092.
111. Matos A, M.J., Pinto D, Medeiros R. , *The influence of smoking and other cofactors on the time to onset to cervical cancer in a southern European population*. Eur J Cancer Prev, 2005. **14**(5): p. 485-491.
112. C., L.V., *Oral contraceptives and cancer*. Minerva Ginecol, 2006. **58**(3): p. 209-214. Review. Italian.
113. Monsonego J, M.H., Catalan F, Coscas Y, Zerati L, Sastre X., *Estrogen and progesterone receptors in cervical human papillomavirus related lesions*. Int J Cancer, 1991. **19**: p. 533-539.
114. Kedzia W, G.-J.A., Kwasniewska A, Schmidt M, Miturski R, Spaczynski M. , *Relationship between HPV infection of the cervix and blood serum levels of steroid hormones among pre- and postmenopausal women*. Eur J Gynecol Oncol, 2000. **221**: p. 177-179.
115. Khare S, K.K., Tang, SC, Pater MM, Pater A. , *Up-regulation of hormone response of human papillomavirus type 16 expression and increased DNA-protein binding by*

- consensus mutations of viral glucocorticoid response elements. J Med Virol, 1996. 50(3): p. 254-262.*
116. Von Knebel Doeberitz M, S.D., Ridder R. , *Interactions between steroid hormones and viral oncogenes in the pathogenesis of cervical cancer. Review. Verth Dtsch Ges Pathol, 1997. 81: p. 233-239.*
117. Yuan F, A.K., James C. , *Altered growth and viral gene expression in human papillomavirus type-16 containing cancer cell lines treated with progesterone. . Cancer Investigation 1999a. 17: p. 19-29.*
118. An HX, Z., L, Cai GR. , *Histochemical study of estrogen and progesterone receptors in cervical carcinoma. J Tongii Med Univ, 1992. 12(1): p. 60-64.*
119. Fife KH, K.B., Roush J, Handy VD, Brown, DR, Hansell R., *Cancer-associated HPV types are selectively increased in the cervix of women in the first trimester of pregnancy. . Am J Obstet Gynecol, 1996. 174: p. 1487-1493.*
120. Fife KH, K.B., Brizendine E.J, Darron R. , *Cervical human papillomavirus deoxyribonucleic acid persists throughout pergnancy and decrease in postpartum period. . Am J Obstet Gynecol, 1999. 180: p. 1110-1114.*
121. Schiff M, M.J., Masuk M., King LA, Altobelli KK, Wheeler CM, Becker TM. , *Contraceptive and Reproductive risk factors for cervical intraepithelial neoplasia en American Indian women. International J of Epidemiology, 2000. 29: p. 983-998.*
122. Gay JD, D.L., Goellner JR., *False negative results in cervical cytologic studies. . Acta Cytol, 1985. 29(6): p. 1043-1046.*

123. Grace A, M.S., Troost M, Thornhill M, Kay E, Leader M. g. , *Comparative study: conventional cervical and ThinPrepR Pap tests in a routine clinical settin.* Cythopathology, 2002. **13**: p. 200-205.
124. Kurman RJ, S.D., *Sistema Bethesda para o relato de diagnóstico Cérvico-vaginal.* 1997, Rio de Janeiro: Revinter.
125. Cox JT, L.A., Schiffman MH, Sherman ME, Cullen A, Kurman RJ. , *Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance.* . Am J Obstet Gynecol, 1995. **172**(3): p. 946-954.
126. Mendes JC, S.L., Paredes AO. , *Lesão intra-epitelial cervical: existe correlação entre o tempo de realização do exame de Papanicolaou e o aspecto do colo uterino?* . RBAC, 2004. **36**(4): p. 191-196.
127. Lonky NM, S.M., Tsadik GW, Petitti D. T, *he clinical significance of the poor correlation of cervical dysplasia and cervical malignancy with referral cytologic results.* . Am J Obstet Gynecol, 1999. **181**(3): p. 560-566.
128. JA., K., *Vaccination as a prevention strategy for human papillomavirus-related diseases. Review.* J Adolesc Health, 2005. **37**(6 Suppl): p. S10-6.
129. SR, W. *Papilomavírus Humano.* [cited 15 de agosto de 2006].
130. Hutchinson ML, Z.D., Sherman ME, Herrero R, Alfaro M, Bratti MC, Hildesheim A, Lorincz AT, Greenberg MD, Morales J, Schiffmann M. , *Utility of liquid-based cytology for cervical carcinoma screening: results of a population-based study conducted in a region of Costa Rica with a high incidence of cervical carcinoma.* . Cancer, 1999. **87**(2): p. 48-55.

131. Nanda K, M.D., Myers ER, Bstian LA, Hasselblad V, Hickey JD., *Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review.* . Ann Intern Med, 2000. **8**: p. 10-19.
132. Jacobs TW, S.J., Schroeder B, Rasa S, Baum JK, Schnitt SJ. , *Accuracy of touch imprint cytology of Image –directed breast core needle biopsies.* . Acta Cytol, 1999. **43**: p. 169-174.
133. S., P., *False-Negative Papnicolaou smears from women with cancerous and precancerous lesions of tehe uterine cervix.* . Acta Cytol, 1991. **35**(1): p. 40-47.
134. Koss, L.G.T., *The Papanicolaou Test for cervical cancer detection: A triumph and a tragedy.* . JAMA, 1989. **261**: p. 737-743.
135. Kinney WK, M.M., Hurley LB, Ransley JE., *Where’s the High-grtade cervical neoplasia? The importance of minimally abnormal papanicolaou diagnosis.* . Obstet Gynecol, 1998. **91**: p. 973-976.
136. JB., M., *Colposcopia e Patologia Cervical*, ed. F.E. BYK. 1997, São Paulo.
137. Sherman ME, S.M., Cox JT. , *Atypical Squamous cells of undeterminad significance/Low Grade Squamous intraepithelial lesion triage study group. Effects of age and human papillomavirus viral load on colposcopy triage: data from the randomized atypical squamous cells of undeterminaded significance/Low-grade Squamous Intraeoithelial Lesion Triage Study (ALTS).* . Jnatl Cancer Inst 2002. **94**(2): p. 102-17.
138. Manos MM, K.W., Hurley LB, Sherman ME, Sieh-Ngai JMS, Kurman RJ, Ransley JE, Fettzman BJ, Hartinger JSCT, McIntosh KM, Pawlick GF, Hyatt RA. , *Identifying women with cervical neoplasia: Using Human Papillomavirus DNA testing for equivocal papnicolaou results.* JAMA, 1999. **281**(17): p. 1605-1610.

139. Cubie HA, S.A., Mc Googan E, Whitehead J, Brass A, Arends MJ, Whitley MW. , *Rapid real time PCR to distinguish between high risk human papillomavirus types 16 eand 18.* Mol Pathol, 2001. **54**(1): p. 24-29.
140. Agoff SN, L.P., Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA., *P16INK4a Expression correlates with degree of cervical neoplasia: A comparison with Ki-67 expression and detection of High-risk HPV types.* . Mod Pathol, 2003. **16**(7): p. 665-673.
141. Cope JU, H.A., Shifmann MH, Manos MM, Lorincz AT, Burk RD, Glass AG, Greer C, Buckland J, Helgesen K, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Liaw KL. , *Comparison of the hybrid capture tube test and PCR for detection of human papillomavirus DNA in cervical specimens.* Journal of Clinical Microbiology, 1997. **35**(9): p. 2262-2265.
142. Sherman ME, S.M., Lorincz AT, Manos MM, Scott DR, Kuman RJ, Kiviat NB, Stoler M, Glass AG, Rush BB., *Toward objective quality assurance in cervical cytopathology. Correlation of cytopathologic diagnoses with detection of high-risk human papillomavirus types.* Am J Clin Pathol. , 1994. **102**(2): p. 182-187.
143. Nuovo J, M.J., Howell LP., *New tests for cervical cancer screening.* . Am Fam Physician, 2001. **64**: p. 780-786.
144. Clavel C, M.M., Putaud I. Thomas K, Bory JP, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P. , *Hybrid Capture II, a new sensitive test for a Human Papillomavirus detection-comparison with hibrid capture I and PCR results n cervical lesions.* . J Clin Pathol, 1998. **51**: p. 737-740.
145. Nuovo GJ, B.J., Margiotta M, MacConnell P, Comite S, Hochman H. , *Histological distribution of polymerase chain reaction--amplified human papillomavirus 6 and 11 DNA in penile lesions.* Am J Surg Pathol, 1992. **16**(3): p. 269-275.

146. Gravitt PE, M.M., *Polymerase chain reaction-based methods for the detection of human papillomavirus DNA*. IARC Sci Publ, 1992. **119**(121-123. ).
147. Ledger WJ, J.J., Witkin SS. , *Testing for high-risk human papillomavirus types will become a standard of clinical care. . Am J Obstet Gynecol*, 2000. **182**: p. 860-865.  
Review.
148. Schiller JT, N.-H.D., *Chapter 17: Second generation HPV vaccines to prevent cervical cancer*. Vaccine, 2006. **24S3**: p. S3/147-S3/153.
149. Hillman RJ, R.B., Botcherby M, Walker MM, Taylor-Robinson D. , *Human papillomavirus DNA in the urogenital tracts of men with genital dermatoses: evidence for multifocal infection. . Int J STD AIDS*, 1993. **4**(3): p. 147-154.
150. Mant C, K.B., Best JM, Cason J. , *Polymerase chain reaction protocols for the detection of DNA from mucosal human papillomavirus types 6, 11, 18, 31 e 33. . J Viral Methods*, 1997. **66**(2): p. 169-178.
151. Olatunbosun OA, D.H., Pierson RA. , *Human papillomavirus DNA detection in sperm using polymerase chain reaction. . Obstet Gynecol*, 2000. **95**(4 suppl): p. S56.
152. Boyd AS, A.M., Rapini RR, Adler-Storthz K, Duvic M. , *False-positive polymerase chain reaction results for human papillomavirus in lichen planus. . J Am Acad Dermatol*, 1996. **35**: p. 42-46.
153. Lo AC, F.S., *Polymerase chain reaction: Basic Concepts and clinical application in dermatology. . J Am Acad Dermatol* 1994. **30**(250-260.).
154. Mitrani-Rosenbaum S, T.R., Laviee O, Boldes R, Anteby E, Schimonovitch S, Lasarovitch T, Friedmann A. , *Simultaneous detection of three common sexually transmitted agents by polymerase chain reaction. . Am J Obstet*, 1994. **171**: p. 784-790.

155. Taha NS, F.J., Ribalta JC, Castelo A, Lorincz A, Dores GB. , *Universal Collection Medium (UCM) is as suitable as the Standard Transport Medium (STM) for Hybrid Capture II (HC-2) assay.* . J Clin Virol, 2006. **36**(1): p. 32-35.
156. Peyton CL, S.M., Lorincz AT, Hunt WC, Mielzynska I, Bratti C, Eaton S, Hildesheim A, Morera LA, Rodriguez AC, Herrero R, Sherman ME, Wheeler CM. , *Comparison of PCR-and Hybrid Capture-based human Papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies.* . J of Clinical Microbiology, 1998. **36**: p. 3248-3254.
157. Venturoli S, Z.M., La Placa Jr M, D'antuono A, Negosanti M, Gentilomi G, Gallinella G, Manaresi E, Musiani M. , *Evaluation of immunoassays for the detection and typing of PCR amplified human papillomavirus DNA.* . J Clin Pathol, 1998. **51**: p. 143-148.
158. Poljak M, B.A., Seme K, Vince A, Marin IJ. , *Comparative evaluation of First- and Second-Generation Digene Hybrid Capture Assays for detection of Human Papillomaviruses associated with high or intermediate risk for cervical cancer.* . J of Clinical Microbiology, 1999. **37**: p. 796-797.
159. Bozzetti M, N.B., Mielzinska II, Villa L, Breitenbach VV, Prolla JC. , *Comparison between hybrid capture II and polymerase reaction results among women at low risk for cervical cancer.* Ann Epidemiol, 2000. **10**(7): p. 466.
160. Schiffman M, W.C., Castle PE; A., *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study Group.* . J Infect Dis, 2002. **188**(8): p. 1169-1172.
161. Venturoli S, C.M., Bonvicini F, Giosa F, Pulvirenti FR, Galli and M.M. C, Zerbini M. , *Human papillomavirus DNA testing by PCR-ELISA and hybrid capture II from a single*

- cytological specimen: concordance and correlation with cytological results.* . J Clin Virol, 2002. **25**(2): p. 177-185.
162. Carvalho MOO, C.F., Ribeiro MO, Marinho M, Barbosa FM, Silva LE, Dimetz T, Oliveira LHS, Cavalcanti SMB., *Comparative Analysis of the Polimerase Chain Reaction and the Htbrid Capture Asay for the detection of Human Papillomavirus Infection.* DST-J.BrasDoenças Sex Transm 2004. **16**(1): p. 26-30.
163. Petignat P, F.D., Goffin F,Billieux MH, Stucki D,Sporri S, Vassilakos P. , *Age-related performance of human papillomavirus testing used as an adjunct to cytology for cervical carcinoma screening in a population with a low incidence of cervical carcinoma.* . Cancer, 2005. **105**(3): p. 126-132.
164. Meschede W, Z.K., Braspenning J, Scheffner M, Benitez-Bribiesca L, Luande J, Gissmann L, Pawlita M. , *Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer.* . J Clin Microbiol, 1998. **36**(2): p. 475-480.
165. Christensen ND, K.J., *Antibody-mediated neutralization in vivo of infectious papillomavirus.* . J Virol, 1990. **64**: p. 3151-3156.
166. Christensen ND, R.C., Cladel NM, Hall K, Leiserowitz GS. , *Monoclonal antibodies to HPV- 6 L1 virus-like particles identify conformational and linear epitopes on HPV 11 in addition to type-specific epitopes on HPV-6.* . virology, 1996. **22**: p. 477-486.
167. Alberts B, B.D., Johnson A, Lewis J, Raff M, Robeerts K, Walter P., *Controle do Ciclo Celular.*, in *Fundamentos Da Biologia Celular.* 1999, ArtMed: Porto Alegre. p. 585-604.
168. Filho AL, A.V., *Reação da Polimerização em cadeia.*, in *Lesões relacionadas à infecção pelo HPV no trato anogenital.*, M.F.A. Bibbo M, Editor. 1998, Revinter: Rio de Janeiro.

169. Koyamatsu Y, Y.M., Nakao Y, Fukuda K, Saito T, Matsukuma K, Iwasaka T. , *A comparative analysis of human papillomavirus types 16 and 18 and expressing of p53 gene and Ki-67 in cervical, vaginal, and vulvar carcinomas.* . Gynecol Oncol, 2003. **90**: p. 547-551.
170. B., L., *Ciclo Celular e regulação do crescimento.*, in *Genes VII.*, L. B., Editor. 2001, ArtMed: Porto Alegre. p. 799-836.
171. B., L., *Oncogenes e Câncer.*, in *Genes VII.*, L. B., Editor. 2001, ArtMed.: Porto Alegre. p. 837-873.
172. Coker AL, G.T., King MR, Jackson KL, Pirisi L. , *High-Risk HPVs and risk of Cervical Neoplasia: a case-control study.* . Experimental and Molecular Pathol, 2001. **70**: p. 90-95.
173. Hong MK, L.W., Herman BE, Johnston MH, Vargo JJ, Steinberg SM, Allegra CJ, Johnston PG. , *Expansion of the Ki-67 proliferative compartment correlates with degree of dysplasia in Barrett's esophagus.* . Cancer, 1995. **75**(2): p. 423-429.
174. Garzetti GG., C.A., Lucarini G., Goteri G., De Nctolis M., Muzioli M., Fabris N, Romanini C, Biagini G. , *MIB-1 immunostaining in stage I squamous cervical carcinoma: Relationship with Natural Killer Cell Activity.* Gynecol Oncol, 1995. **58**: p. 28-33.
175. Junior JE, C.D., Medeiros FC & Ferreira FVA. , *Estudo imunocitoquímico de proliferação celular (MIB-1) em sedimento de fluido peritoneal na endometriose pélvica.* . RBAC, 2002. **34**(2): p. 71-73.
176. Carrilho C, G.P., Cantel M, Alberto M, Buane L, David L. , *Characterization of human papillomavirus infection, P53 and Ki-67 expression in cervix cancer of Mozambican women.* . Pathol Res Pract. , 2003. **199**(5): p. 303-311.

177. Logani S, L.D., Quint WGV, Ellenson LH, Pirog EC. , *Low-grade vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia: correlation of histologic features with human papillomavirus DNA detection and MIB-1 immunostaining.* . Modern Pathology, 2003. **16**(8): p. 735-741.
178. Mittal KR, P.J., *Cervical condylomas show higher proliferation than do inflamed or metaplastic cervical squamous intraepithelium.* Mod Pathol, 1998. **11**: p. 780-783.
179. Propiolek D, V.K., Mittal K., *Distinction of low-grade squamous intraepithelial lesions from high-grade squamous intraepithelial lesions base don quantitative analysis of proliferative activity.* . Oncology Reports, 2004. **11**: p. 687-691.
180. Frolova II, M.G., Radzinskii VE, Sheliastina NN, Babichenko II. , *Immunohistochemical examinations of dyskeratosis and exocervical neoplasia in gynecological pathology.* . Arkh Patol, 2002. **64**(6): p. 23-26.
181. Kruse AJ, G.E., Helliesen T, Janssen EA, van Diermen B, Sandvik S, Baak JP. , *Evaluation of prospective, routine application of Ki-67 immunoquantitation in early CIN for assessment of short-term progression risk.* Anal Quant Cytol Histol., 2004. **26**(3): p. 134-140.
182. Kruse AJ, S.I., Janssen EA, Buhr-Wildhagen S, Klos J, Arends MJ, Baak JP. , *Quantitative molecular parameters to identify low-risk and high-risk early CIN lesions: role of markers of proliferative activity and differentiation and Rb availability.* . Int J Gynecol Pathol, 2004. **23**(2): p. 100-109.
183. Walts AE, L.J., Bose S. , *P16 and Ki67 immunostaining is a useful adjunct in the assessment of biopsies for HPV-associated anal intraepithelial neoplasia.* Am J Surg Pathol, 2006. **30**(7): p. 795-801.

184. Hengst L, D.V., Slingerland JM, Lees E, Reed SI. , *A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases.* . Proc Natl Acad Sci USA, 1994. **91**: p. 5291-5295.
185. Zaragoza, O.P.R., M.B.; Benítez, C.E.D. & Marina, V.M. , *Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapêuticas.* . Salud Publica Mex, 1997. **39**: p. 451-462.
186. Tycko B, A.J., *Epigenetics and its role in disease.* J Clin Invest, 2000. **105**(3): p. 245-246.
187. Tierney Jr LM, M.P.S.M.A.P., Ralph Gonzales, Roni Ziegler. *Tumour Supressor Genes.* Current medical Diagnosis & Treatment [cited 2006 junho 2006].
188. Mc Donald ER III, E.-D.W., *Checkpointes gene in cancer.* . Annals of Medicine., 2001. **33**(2): p. 113-122.
189. Hahn WC, W.R., *Mechanisms of Disease: Rules for making human tumor cells.* . The New England Journal of Medicine 2002. **347**(20): p. 1593-1603.
190. Böttger A, B.V., Sparks A, Liu WL, Howard SF, Lane DP. , *Design of a synthetic Mdm2-binding mini protein that activates the p53 response in vivo.* Curr Biol 1997. **7**(11): p. 860-869.
191. MA., D., *A review of the natural history of cervical intraepithelial neoplasia.* . GanTo Kagaku Ryoho, 2002. **29**(suppl 1): p. 176-193.
192. Jeannon JP , W.J., *Cyclins, cyclin-dependent kinases, cyclin-dependent kinases inhibitors and their role in head and neck cancer.* . Clinicl Otolaryngology 1998. **23**(5): p. 420-424.
193. Stewart ZA, W.M., Pietenpol JA. , *Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy.* . Trend Pharmacol Sci, 2003. **24**(3): p. 139-145. Review.

194. Nakashima R, F.M., Enomoto T, Haba T, Yoshino K, Wada H, Kurachi H, Sasaki M, Wakasa K, Inoue M, Buzard G, Murata Y. , *Alteration of p16 and p15 genes in human uterine tumours.* . British Journal of Cancer, 1999. **80**(3/4): p. 478-467.
195. Cho NH, K.Y., Kim JW. , *Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus: cyclin-dependent kinase inhibitors. Review.* Yonsei Med J, 2002. **43**(6): p. 422-428. Review.
196. Tsai JH, P.Y., Lin LY, Chou MC, Lee H, Chiou HL., *An association between human papillomavirus 16/18 deoxyribonucleic acid in peripheral blood with p16 protein expression in neoplastic cervical lesions.* . Cancer Detection and Prevention 2005. **29**: p. 537-543.
197. Kang S, K.J., Kang GH, Park NH, Song YS, Kang SB, Lee HP. , *Polymorphism in folate- and methionine-metabolizing enzyme and aberrant CpG island hypermethylation in uterine cervical cancer.* . Gynecol Oncol, 2005. **96**(1): p. 173-80.
198. Klaes R, F.T., Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. , *Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri.* Int J Cancer, 2001. **92**(2): p. 276-284.
199. Ortega S, M.M., Barbacid M. , *Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer.* . Biochim Biophys Acta, 2002. **1602**(1): p. 73-87. Review.
200. Malanchi I, C.S., Krützfeldt M, Giarre M, Alunni-Fabbroni A, Tommasino M. , *Identification of a novel activity of human papillomavirus type 16 E6 protein in desregulating the G1/S transition.* Oncogene, 2002. **21**: p. 5665-5672.

201. Klaes R, B.A., Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, Kurman RJ, Schmidt D, Stoler M, von Knebel Doeberitz M. , *p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia*. Am J Surg Pathol, 2002. **26**(11): p. 1389-1399.
202. Masumoto N, F.T., Ishikawa M, Saito M, Iwata T, Fukuchi T, Susumu N, Mukai M, Kubushiro K, Tsukazaki K, Nozawa S. P, *P16 overexpression and human papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix*. Hum Pathol, 2003. **34**(8): p. 778-783.
203. Van de Putte G, K.G., Lie AK, Baekelandt M, Holm R. , *Cyclins and proliferation markers in early squamous cervical carcinoma*. . Gynecol Oncol, 2004. **92**(1): p. 40-46.
204. Lorenzato M, C.S., Bronner C, Evrard G, Simon M, Durlach A, Birembaut P, Clavel C. , *Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions?* . Hum Pathol, 2005. **36**(10): p. 1101-1107.
205. Nobori T, M.K., Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson D. , *Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers*. . Nature, 1994. **368**: p. 753-756.
206. Lukas J, P.D., Aagard L, Mann DJ, Bartkova J, Strauss M, Peters G, Bartek J. R, *Retinoblastoma-protein-dependent cell cycle inhibition by the tumour suppressor p16*. Nature, 1995. **375**: p. 503-510.
207. Kleif SN, D.G.J., Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR, Howley PM. , *Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity*. . Proc Natl Acad Sci USA, 1996. **93**: p. 4350-4354.

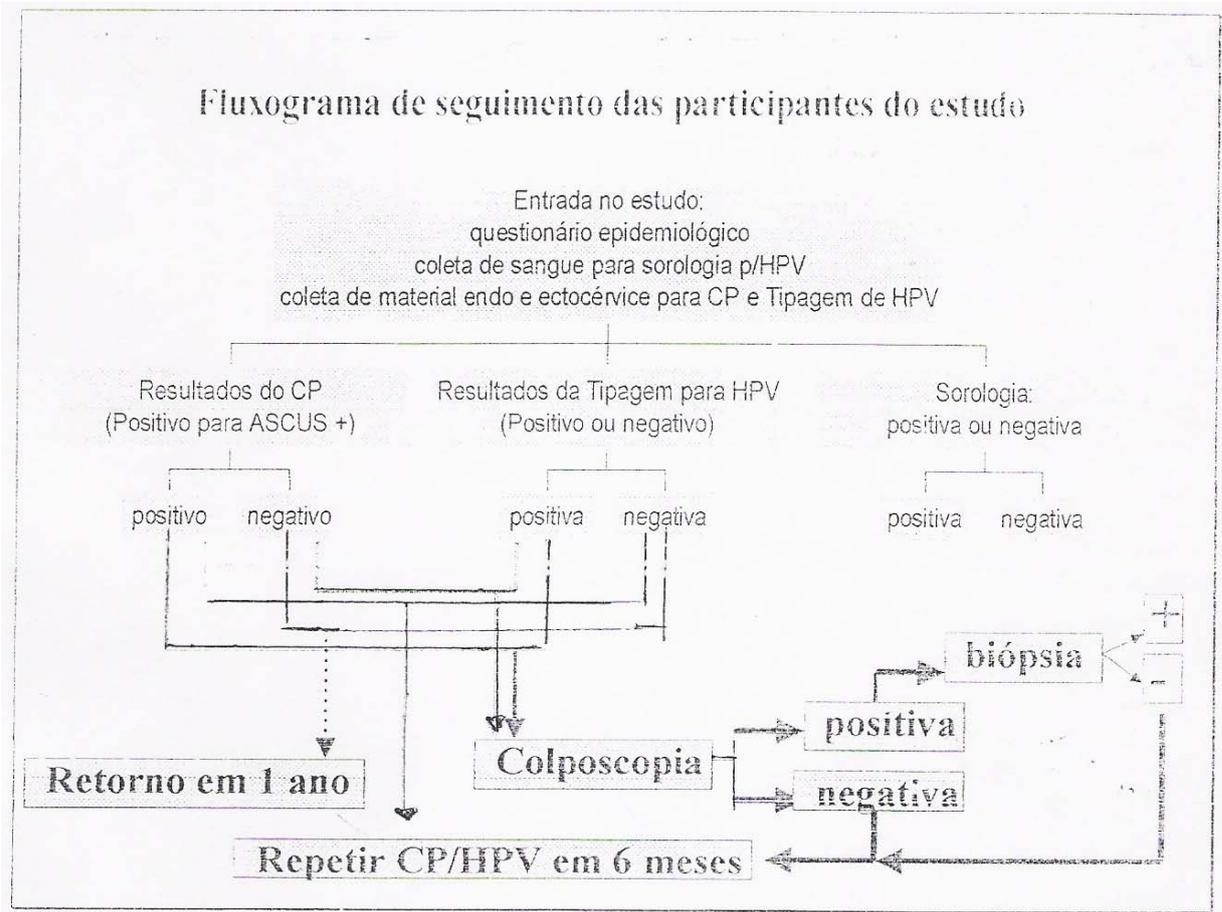
208. Sano T, O.T., Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T., *Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions.* . Am J Pathol, 1998. **153**(6): p. 1741-1748.
209. Munirajan A.K.; Kannam, K.B., V.; Ishida, I.; Fujinara,K.; Tsuchida,N. & Shanmugam,G., *The status of human papillomavirus and tumor suppressor genes p53 and p16 in carcinomas of uterine cervix from India.* India Gynecol Oncol, 1998. **169**(3): p. 205-209.
210. Wong YF, C.T., Cheung TH, Nobori T, Yu AL, Yu J, Batova A, Lai KWH, Chang AMZ. , *Methylation of p16INK4A in primary gynecologic malignancy.* . Cancer Letters, 1999. **136**: p. 231-235.
211. Park JS, D.S., Kim SH, Lee JY, Um SJ, Park IS, Kim SJ, Namkoong SE. , *Detection of p16 gene alteration in cervical cancer using tissue microdissection and LOH study.* . Cancer Letters 1999. **136**: p. 101-8.
212. Virmani AK, M.C., Rathi A, Zoechbauer- Mueller S, Mathis M, Gazdar AE. , *Aberrant methylation during cervical carcinogenesis.* Clin Cancer Res. , 2001. **Mar;7**(3): p. 584-9.
213. Yang HJ, L.V., Wang Y, Chan KYK, Tsang PCK, Khoo US, Cheung ANY, Ngan HYS., *Detection of hypermethylation in tumor and plasma of cervical cancer patients.* Gynecol Oncol, 2004. **93**: p. 435-440.
214. Kim JW, N.S., Ryu SW, Kim HS, Shin JW, Lee JM, Kim DH, Kim K. , *Absence of p15INK4B and p16INK4A gene alterations in primary cervical carcinoma tissues and cell lines with Human Papillomavirus infection.* . Gynecologic Oncology, 1998. **70**: p. 75-79.
215. Dong SM, K.H., Rha SH, Sidransky D. , *Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix.* Clin Cancer Res, 2001. **Jul;7**(7): p. 1982-6.

216. Klies R, B.A., Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, Kurman RJ, Schmidt D, Stoler M, von Knebel Doeberitz M. , *p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia*. . Am J Surg Pathol., 2002. **26**(11): p. 1389-1399.
217. Bibbo M, K.W., De Cecco J, Kovatich AJ., *Procedure for immunocytochemical detection of P16INK4A antigen in thin-layer, liquid-based specimens*. Acta Cytol, 2002. **46**(1): p. 25-29.
218. Yoshida T, F.T., Sano T, Kanuma T, Owada N, Nakajima T. , *Usefulness of liquid-based cytology specimens for the immunocytochemical study of p16 expression and human papillomavirus testing: a comparative study using simultaneously sampled histology materials*. . Cancer, 2004. **102**(2): p. 100-108.
219. Nieh S, Y.S., Chu TY, Lai HC, Lin YS, FU E, Gau CH.. *Is p16(INK4A) 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 biopsie*. Gynecol Oncol, 2005. **97**(1): p. 35-40.
220. Kalof AN, C.K., *p16INK4a immunoexpression: surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia*. . Adv Anat Pathol., 2006. **13**(4): p. 190-194. Review.
221. O'Neill CJ, M.C.W., *p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis*. Adv Anat Pathol., 2006. **13**(1): p. 8-15. Review.
222. Sahebali S, D.C., Boulet GA, Arbyn M, Moeneclaey LM, Vereecken AJ, Van Marck EA, Bogers JJ. , *Immunocytochemistry in liquid-based cervical cytology: analysis of clinical use following a cross-sectional study*. . Int J Cancer, 2006. **118**(5): p. 1254-1260.

223. Benevolo M, M.M., Marandino F, Vocaturo G, Sindico R, Piperno G, Mariani L, Sperduti I, Canalini P, Donnorso RP, Vocaturo A. , *Immunohistochemical expression of p16(INK4a) is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions.* . Mod Pathol, 2006. **19**(3): p. 384-391.
224. Astbury K, M.C., Ring M, Pilkington L, Bolger N, Scheils OM, O'Leary JJ., *Future Molecular aspects of cervical cytology.* Curr Diagn Pathol, 2006. **12**: p. 104-113.
225. Emig R, M.A., Ehemann V, Meyer A, Stilgenbauer F, Volkmann M, Wallwiener D, Sinn HP. , *Aberrant cytoplasmic expression of the p16 protein in breast cancer is associated with accelerated tumour proliferation.* . Br J Cancer, 1998. **78**(12): p. 1661-1668.
226. Milde-Langosch K, B.A., Rieck G, Kelp B, Loning T. O and B.C.R.T.M. 67(1):61-70., *overexpression of the p16 cell cycle inhibitor in breast cancer is associated with a more malignant phenotype.* Breast Cancer Res Treat., 2001. **67**(1): p. 61-67.
227. Jung SM, L.H., Chu PH, Wu HH, Shiu TF, Huang SL, Lai CH. , *Expression of cell cycle-regulatory proteins, MIB-1, p16, p53, and p63, in squamous cell carcinoma of conjunctiva: not associated with human papillomavirus infection.* Virchows Arch, 2006. **448**(3): p. 301-305.
228. Guimaraes MC, G.M., Soares CP, Bettini JS, Duarte RA, Soares EG. , *Immunohistochemical expression of p16INK4a and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions.* . J Histochem Cytochem. , 2005. **53**(4): p. 509-516.
229. Queiroz C, S.T., Alves VA, Villa LL, Costa MC, Travassos AG, Filho JB, Studart E, Cheto T, de Freitas LA. , *Comparative study of the expression of cellular cycle proteins in cervical intraepithelial lesions.* . Pathol Res Pract, 2006. **202**(10): p. 731-737.

230. Roden R, W.T., *How will HPV vaccine affect cervical cancer?* Nature Reviews, 2006. **6**: p. 753-763.
231. Mandic A, V.T., *Human papillomavirus vaccine as a new way of preventing cervical cancer: a dream or the future? Review.* Ann Oncol, 2004. **15**(2): p. 197-200. .
232. Lollini PL, C.F., Nanni P, Forni G., *Vaccines for tumour prevention.* Nat Rev Cancer. , 2006. **6**(3): p. 204-16.
233. Giles M, G.S., *A study of women's knowledge regarding human papillomavirus infection, cervical cancer and human papillomavirus vaccines.* Aust N Z J Obstet Gynaecol., 2006. **46**(4): p. 311-315.
234. JA, F., *Prevention of cervical cancer trough papillomavirus vaccination* Nat Rev Immunol, 2004. **4**: p. 46-54.
235. Giles M, G.S., *Human papillomavirus infection: an old disease, a new vaccine.* Aust N Z J Obstet Gynaecol. , 2006. **46**(3): p. 180-185.
236. I., F., *Vaccine for papillomavirus infection.* Virus Research, 2002. **89**: p. 271-274.
237. Inglis S, S.A., Koenig S., *Chapter 11: HPV vaccines: Commercial Research & Development.* Vaccine, 2006. **24S3**: p. S3/99-S3/105.
238. Collussi., C. (2006) *Folha on line.* . **Volume,** DOI: [www2.uol.jornaldecampos/681/hpv.htm](http://www2.uol.jornaldecampos/681/hpv.htm)).

## Anexos:



Anexo 1: Fluxograma de seguimento das participantes do estudo



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**  
**Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação**  
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

**RESOLUÇÃO**

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 03-083

**Versão do Projeto:** 13/03/2003

**Versão do TCLE:** 13/03/2003

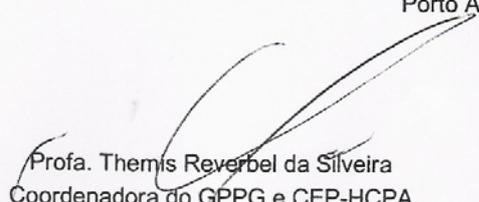
**Pesquisadores:**

MARIA ISABEL EDELWEISS  
LUCIANE CALIL MYLIUS  
MARY CLARISSE BUSETTI  
ELIZABETH CORTES HERRERA  
MARILDA TEREZA MAR DA ROSA  
CRISTINE NASCENTE IGASI  
JULIO SOMENSI DE OLIVEIRA

**Título:** INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E ALTERAÇÕES NO GENE P16 EM CÂNCER DE CÉRVICE UTERINA. RELAÇÃO COM ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

Porto Alegre, 03 de abril de 2003.

  
Profa. Themis Reverbél da Silveira  
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

Anexo 2: Carta de aprovação Comitê de Ética/GPPG do HCPA

Aprovação do Comitê em Ética do grupo Hospitalar Conceição



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO  
CEP - GHC  
RESOLUÇÃO**

Porto Alegre, 15 de janeiro de 2003.

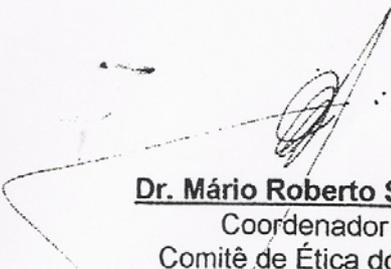
O Comitê de Ética em Pesquisa-CEP-GHC, em reunião ordinária em 15/01/2003 analisou o projeto de pesquisa:

**Nº 112/2002**

**Título:** A distribuição de papilomavirus humanos oncogênicos e sua associação com lesões do colo cervical.

**Pesquisador (es):** Mary Clarisse Bozzetti

Este trabalho, bem como o Termo de Consentimento livre e Esclarecido, no aspecto ético e metodológico, por estarem de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96) obtiveram o parecer **APROVADO**. O autor deverá encaminhar relatórios semestrais sobre o andamento do projeto. Projetos de áreas temáticas especiais não podem ser iniciados sem a aprovação da CONEP. Após conclusão do trabalho, o pesquisador deverá encaminhar relatório final ao Centro de resultados onde foi desenvolvida a pesquisa e ao Comitê de Ética em Pesquisa.

  
**Dr. Mário Roberto Silveira**  
Coordenador  
Comitê de Ética do GHC

Anexo 3: Carta de Aprovação Comitê de ética GHC

## TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

A Distribuição de Papilomavírus Oncogênicos e Sua Associação Com Lesões do Colo Uterino

Protocolo nº: \_\_\_\_\_

Financiamento: CAPES-PROF (UFRGS); FIPE/HCPA; FAPERGS; LACEN/RS

Apoio: GSC/GHC

Investigador Principal: Dra. Mary Clarisse Bozzetti

A infecção genital pelo Papilomavírus Humano é uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns. É causada pelo vírus conhecido como Papilomavírus Humano ou HPV. Este vírus é o principal agente causador do câncer de colo de útero. Pelo fato deste ser um câncer bastante comum entre as mulheres em nosso meio e, embora possa ser diagnosticado precocemente e as mulheres curadas, ele ainda é responsável por um grande número de mortes entre as mulheres em nosso meio. Por isso, a busca de métodos para um diagnóstico mais precoce e mais acessível à toda população têm sido tema de muitas pesquisas.

Nós planejamos um estudo que tem como principal enfoque a identificação e o acompanhamento de mulheres portadoras do HPV bem como de outras lesões associadas presentes no colo uterino. Por isso estamos convidando-a a fazer parte deste estudo, cujos objetivos, procedimentos, riscos e benefícios estão descritos a seguir.

### Objetivos do estudo:

O presente estudo tem como objetivos verificar a presença e distribuição de acordo com a idade dos tipos de HPV que estão mais associados ao câncer de colo de útero. A presença deste vírus será estudada em material coletado no colo uterino e no sangue. A identificação da presença deste vírus, a detecção de uma proteína chamada P16, presente em células com HPV ativo e o acompanhamento das mulheres que participarão do estudo permitirá entender melhor porque algumas mulheres evoluem para lesões de colo de útero de alto grau ou mesmo câncer.

### Procedimentos:

As mulheres que concordarem em participar do estudo, serão inicialmente entrevistadas para responder algumas questões relacionadas à sua saúde, após será realizado um exame ginecológico no qual será coletado, através do uso de uma escova especial para este exame, material da parte externa e do canal do colo uterino. Deste material será realizado o exame citológico (preventivo do câncer de colo de útero) e material para investigar a presença do HPV.

As mulheres que tiverem o exame citológico alterado e/ou que tiverem a presença do HPV ao exame serão encaminhadas para a realização de uma colposcopia, que um exame semelhante ao exame ginecológico, onde se observa o colo do útero com lente de aumento. Se neste exame for constatada a presença de alguma lesão no colo do útero, será realizada uma biópsia desta lesão, que significa retirar um pequeno fragmento da lesão e encaminhar para um exame mais minucioso, chamado exame histopatológico e também, neste mesmo fragmento será estudado se existe alguma alteração na proteína P16.

Também será coletado nas mulheres que concordarem em participar do estudo, 20 ml de sangue. Deste sangue será isolado o soro, que será congelado e posteriormente será feita a verificação da presença do HPV.

As mulheres participantes do estudo serão acompanhadas de acordo com os resultados dos exames mencionados acima. A frequência de visitas médicas poderá ser no mínimo semestral e no máximo anual. Sendo que os procedimentos em cada consulta serão os mesmos descritos acima.

#### Riscos e Desconfortos:

Os riscos e desconfortos às participantes deste estudo são aqueles associados aos procedimentos descritos acima, ou seja, a coleta de material para o exame citológico e para o HPV poderão, de modo pouco freqüente, causar um pequeno sangramento local, que cessará espontaneamente. Para as mulheres que necessitarem a realização de biópsia, poderá também ocorrer um pequeno sangramento com melhora espontânea e eventualmente poderá haver um pouco de dor local, também passageira. A coleta de sangue é de uma quantidade pequena (20 ml) e por isso dificilmente causará algum mal-estar geral ( 1 em cada 1000 pessoas), no entanto poderá haver dor no local da coleta e eventualmente um pequeno hematoma. Os demais procedimentos serão feitos em material já coletado e congelado para posterior exame e por isso não causarão desconfortos às participantes do estudo.

#### Benefícios:

Os benefícios diretos do estudo às participantes serão: estas terão a oportunidade de serem identificadas com lesões pré-cancerosas do colo de útero e tratadas antes da evolução destas lesões; aquelas que forem positivas a algum tipo de HPV de alto risco para o câncer de colo uterino e que não tiverem lesões aparentes, serão acompanhadas com uma frequência maior visando acompanhar e tratar as possíveis lesões que se desenvolverem.

Como benefício indireto estas mulheres estarão contribuindo com informações fundamentais para ampliar o conhecimento desta doença e de sua evolução (prognóstico) para o conhecimento científico, já que está é uma doença altamente prevenível e curável se detectada precocemente e que no entanto ainda está entre as causas de morte por câncer mais comuns entre as mulheres, especialmente em nosso meio.

#### Compensação financeira:

Não haverá nenhum pagamento às mulheres que concordarem em participar do estudo, bem como as participantes do estudo não terão nenhum custo adicional relacionado aos procedimentos e às visitas médicas.

Confidencialidade:

Toda a informação que será fornecida pelas participantes do estudo e os resultados advindos dos procedimentos realizados será considerada confidencial e será somente conhecida da equipe envolvida no estudo. Todos os questionários e materiais coletados serão identificados através de um código criado na entrada do estudo, este código será a única identificação utilizada no banco de dados do estudo que será utilizado para análise dos dados e divulgação dos mesmos no meio científico.

Perguntas e dúvidas relacionadas ao estudo:

Este termo de consentimento explica de forma clara o estudo que estamos propondo e convidando as mulheres à participar, no entanto se houver alguma dúvida estas serão esclarecidas pela equipe do estudo, através da Dra. Mary Clarisse Bozzetti em qualquer momento do estudo pelo telefone 3333 8779.

Em caso de danos:

Se a participante do estudo acha que teve algum problema de saúde relacionado com a sua participação no estudo ou se tem alguma pergunta sobre os cuidados médicos que necessita esta deverá contatar a coordenadora do estudo Dra. Mary Clarisse Bozzetti pelo seguinte telefone: 3333 8779.

Se houver algum dano à sua saúde resultante de sua participação, receberá os cuidados médicos necessários sem custos adicionais. Não haverá, no entanto, compensação financeira, apenas atendimento médico e hospitalar quando indicado.

Participação voluntária:

A participação de cada mulher no estudo é voluntária, ou seja, que não quiser participar do estudo estará livre para fazê-lo sem que haja qualquer perda no atendimento de seus problemas de saúde a que tem direito.

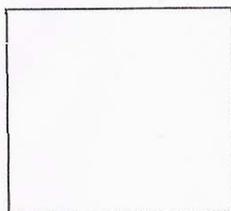
Se concordar em participar do estudo e mudar de idéia durante o decorrer do mesmo, estará livre para fazê-lo, e da mesma forma não sofrerá perdas relacionadas ao atendimento a que tem direito para seus problemas de saúde.

O Significado de Sua Assinatura:

A sua assinatura abaixo significa que você entendeu a informação que lhe foi fornecida sobre o estudo e sobre este termo de consentimento. Se você assinar este documento significa que você concorda em participar do estudo.

VOCÊ RECEBERÁ UMA CÓPIA DESTE TERMO DE CONSENTIMENTO

carimbo do estudo



---

\_\_\_\_\_  
Assinatura da paciente e/ou responsável (se menores de 18 anos) Data:

---

\_\_\_\_\_  
Assinatura da pessoa que obteve o consentimento Data:

---

\_\_\_\_\_  
Assinatura do coordenador do estudo Data:

## PREVENÇÃO E DETECÇÃO PRECOCE DE CÂNCER DE COLO UTERINO

### I. QUESTIONÁRIO DE ENTRADA NO ESTUDO

NOTA: Toda informação será mantida sob estrita confidencialidade. Este questionário será armazenado em arquivos fechados. Seu número de identificação será a única conexão à informação coletada.

QUEST \_\_\_\_\_

1. Nome: \_\_\_\_\_

2. Endereço: \_\_\_\_\_

3. Telefone de contato: \_\_\_\_\_

4. Data de nascimento? \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ (dd/mm/aaaa)

DNASC: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

5. Data da entrevista? \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ (dd/mm/aaaa)

DENT: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

6. Idade: \_\_\_ (em anos)

IDADE: \_\_\_

7. Estado marital:

ESTMARIT: \_\_\_

(1) Casada ou com companheiro fixo há pelo menos 1 ano

(2) Com companheiro há menos de 1 ano (3) Solteira

(4) Divorciada/desquitada (5) Separada

(6) Viúva

8. Ocupação: \_\_\_\_\_ OCUP: \_\_\_

9. Cor da pele:

(1) branca (2) negra (3) mulata (4) amarela

COR: \_\_\_

10. Escolaridade:

ESCOLAR: \_\_\_

(1) analfabeta (2) primeiro grau incompleto

(3) primeiro grau completo (4) segundo grau incompleto

(5) segundo grau completo (6) terceiro grau incompleto

(7) terceiro grau completo (9) ignorado

11. Número de pessoas que residem na casa: \_\_\_

PCASA: \_\_\_

12. Renda da família (anotar a renda em reais) \_\_\_\_\_

RENDA: \_\_\_

13. Você fuma? (1) Sim (2) Não

FUMO: \_\_\_

**SE A RESPOSTA À QUESTÃO 13 FOR "NÃO" PULE PARA A QUESTÃO 16**

14. Se sim, há quanto tempo? \_\_\_ (em anos)

TFUMO: \_\_\_

15. Se sim, quantos cigarros fuma por dia? \_\_\_

CIGDIA: \_\_\_

16. Idade da primeira menstruação: \_\_\_

MENARCA: \_\_\_

17. Seus ciclos menstruais são regulares? \_\_\_\_\_ (intervalo)

CMENST: \_\_\_

18. Você ainda menstrua? (1) Sim (2) Não

MENOPI: \_\_\_

**SE A RESPOSTA À QUESTÃO 18 FOR "NÃO" PULE PARA A QUESTÃO 22**

19. Se não, há quanto tempo? \_\_\_ (em anos)

MENOP2: \_\_\_

20. Você faz ou já fez terapia de reposição hormonal?

MENOP3: \_\_\_

(1) Sim (2) Não

21. Se sim, por quanto tempo? \_\_ (em anos)
22. Qual a idade da primeira relação sexual: \_\_
23. Qual o número de parceiros sexuais no último mês: \_\_
24. Qual o número de parceiros sexuais ao longo da vida: \_\_
25. Você utiliza ou utilizou algum método anticoncepcional?  
(1) Sim (2) Não
26. Qual o método anticoncepcional que utiliza ou utilizou?  
(1) Anticoncepcional oral; (2) Anticoncepcional injetável;  
(2) Condon (camisinha); (4) Diaphragma;  
(5) "Camisinha" feminina; (6) DIU/Mirena;  
(7) Cirúrgico (LT); (8) Tabela; (9) Não sabe;  
(10) Não se aplica; (11) Outro: \_\_\_\_\_
27. Já esteve grávida alguma vez? (1) Sim (2) Não
- SE A RESPOSTA À QUESTÃO 27 FOR "NÃO" PULE PARA A QUESTÃO 33**
28. Se sim, quantas vezes? \_\_
29. Que idade tinha na primeira gestação?
30. Quantos filhos nasceram vivos?
31. Já teve algum aborto? (1) Sim (2) Não
32. Se sim, quantos? \_\_
33. Você já teve/tem alguma das seguintes doenças?  
(1) Sim; (2) Não; (9) Não sabe
- Condiloma acuminado/Papilomavírus (verrugas genitais): \_
- AIDS/ HIV positiva: \_
- Sífilis: \_
- Gonorréia: \_
- Candidíase genital: \_
- Clamídia genital: \_
- Herpes genital: \_
- Outra, qual?: \_\_\_\_\_
34. Se sim, você fez algum tipo de tratamento?
35. Se sim, qual? \_\_\_\_\_
36. Seu marido ou companheiro já teve alguma das seguintes doenças? Sim; (2) Não; (9) Não sabe
- Condiloma acuminado/Papilomavírus (verrugas genitais): \_
- AIDS/ HIV positivo: \_
- Sífilis: \_
- Gonorréia: \_
- Candidíase genital: \_
- Clamídia genital: \_
- Herpes genital: \_
- Outra, qual?: \_\_\_\_\_
37. Se sim, você fez algum tipo de tratamento?
38. Se sim, qual? \_\_\_\_\_
39. Você alguma vez já realizou o exame preventivo de colo uterino? (1) Sim; (2) Não; (9) Não sabe
40. Se sim, qual a data do último exame? \_\_\_ / \_\_\_ (mm/aaaa)
- MENOP4: \_\_
- SEXARCA: \_\_
- PARSEX1: \_\_
- PARSEX2: \_\_
- ACO1: \_\_
- ACO2: \_\_
- GESTA1: \_\_
- GESTA2: \_\_
- GESTA3: \_\_
- FVIVOS: \_\_
- ABO1: \_\_
- ABO2: \_\_
- COND: \_
- HIV: \_
- SIFILIS: \_
- GONO: \_
- CANDIDA: \_
- CLAMIDIA: \_
- HERPES: \_
- OUTDST: \_
- TRAT1: \_
- TRAT2: \_
- CONDM: \_
- HIVM: \_
- SIFILISM: \_
- GONOM: \_
- CANDIDAM: \_
- CLAMIDIAM: \_
- HERPESM: \_
- OUTDSTM: \_
- TRATM1: \_
- TRATM2: \_
- CPI: \_
- DATCP: \_\_ / \_\_

41. Você costuma realizar auto-exame de mamas?  
(1) Sim (2) Não MAMA1: \_

42. Se sim, com que frequência?  
(1) diária; (2) semanal; (3) mensal; (4) Outra: \_\_\_\_\_ MAMA2: \_

43. Você já teve ou tem alguns dos seguintes problemas de saúde? (1) Sim (2) Não (9) Não sabe

Doença cardiovascular (HAS, DIC): \_ HDCV: \_

Lesões pré-invasivas de colo de útero: \_ HLPCU: \_

Doença endócrino-metabólica (diabetes): \_ HDEM: \_

Doença Respiratória (asma, dpoc): \_ HDR: \_

Doença psiquiátrica (depressão): \_ HDP: \_

Câncer ginecológico: \_ HCAG: \_

Outro tipo de câncer: \_ HC: \_

44. Se sim, você faz algum tipo de tratamento para o TRATPSI: \_

seu problema de saúde? (1) Sim (2) Não

45. Se sim, qual o tratamento? \_\_\_\_\_ TRATPS2: \_ \_

46. Alguém na sua família (lado materno ou paterno) tem ou teve algum dos seguintes problemas de saúde?

(1) Sim (2) Não (9) Não sabe

Doença cardiovascular (HAS, DIC): \_ HFDCV: \_

Lesões pré-invasivas de colo de útero: \_ HFLPCU: \_

Doença endócrino-metabólica (diabetes): \_ HFDEM: \_

Doença Respiratória (asma, dpoc): \_ HFDR: \_

Doença psiquiátrica (depressão): \_ HFDP: \_

Câncer ginecológico: \_ HFCAG: \_

Outro tipo de câncer: \_ HFC: \_

AIDS(HIV positivo): \_ HFAIDS: \_

47. Se sim, faz algum tipo de tratamento para o TRATPSF1: \_

este problema de saúde? (1) Sim (2) Não

48. Se sim, qual o tratamento? \_\_\_\_\_ TRATPSF2: \_ \_

49. História de óbito na família nos últimos cinco anos?

(1) Sim (2) Não (3) Não sabe ÓBITOF: \_

50. Se sim, qual a idade da pessoa que foi ao óbito: \_\_ (anos) OBFIDAD: \_ \_

51. Se sim, qual a causa da morte? \_\_\_\_\_ CAUSAOBF: \_ \_

OBSERVAÇÕES DO ENTREVISTADOR:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_