



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

ERIKA HARDY LEMOS

ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS Ki-67 E MYC NA PRESENÇA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV), DETECTADO POR HIBRIDIZAÇÃO *in situ*, EM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL (NIC).

FORTALEZA

2013

ERIKA HARDY LEMOS

ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS Ki-67 E MYC NA PRESENÇA DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV), DETECTADO POR HIBRIDIZAÇÃO *in situ*, EM
NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL (NIC).

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientador: Profa. Dra. Sílvia Helena Barem Rabenhorst.

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

H1a HARDY LEMOS, ERIKA.
ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS Ki-67 E MYC NA PRESENÇA DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV), DETECTADO POR HIBRIDIZAÇÃO *in situ*, EM NEOPLASIA
INTRAEPITELIAL CERVICAL (NIC). / ERIKA HARDY LEMOS. – 2013.
87 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2013.
Orientação: Profª. Dra. Sílvia Helena Barem Rabenhorst.

1. NEOPLASIA INTRAEPITELIA CERVICAL. 2. PAPILOMAVIRUS HUMANO. 3. Ki-67. 4.
MYC. 5. MARCADORES MOLECULARES. I. Título.

CDD 616.9

ERIKA HARDY LEMOS

ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS Ki-67 E MYC NA PRESENÇA DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV), DETECTADO POR HIBRIDIZAÇÃO *in situ*, EM
NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL (NIC).

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Médica da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para obtenção do Título de Mestre em
Microbiologia Médica.

Aprovada em: 09/09/2013

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Prof. Dr. José Eleutério Júnior
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Rita de Cássia Carvalho Barbosa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*Ao meu querido e amado marido **MABSAN**,
aos meus filhos maravilhosos **LANA E**
LUCCA, a minha família, aos meus amigos
por todo amor, apoio e incentivo...*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar à graça de ter saúde e pela sua presença constante em minha vida.

Ao meu querido e amado esposo, MABSAN, pelo amor, paciência, compreensão, apoio, estímulo e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus filhos amados LANA e LUCCA, que deram um novo e expressivo sentido a minha vida, trazendo para o meu coração alegria, paz de espírito e doçura.

A minha família, em especial, aos meus irmãos: ILKA, KARINE, ADEMIR E GERARDO; cunhados, MANUEL e GERALDO, e sobrinhos, IURI, SOFIA, PEDRO e PIETRA.

A minha sogra MADALI, que sempre, com muito carinho e amor, permaneceu ao meu lado, sem medir esforços para nos socorrer nas horas que mais precisamos.

A minha secretária ELIETE, que se tornou meu braço direito nos afazeres domésticos, sempre procurando ajudar para facilitar minha rotina sobrecarregada.

Ao programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica representado pelos professores e demais funcionários pelo empenho na formação científica dos pós-graduandos;

A CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

Aos pacientes incluídos nesse estudo e seus familiares;

A professora Dra. Sílvia Helena Barem Rabenhorst, pela dedicada orientação, confiança, carinho e paciência.

A professora Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini, pela presteza em aceitar o convite, pela cuidadosa leitura e pelas valiosas contribuições.

Ao Prof. Dr. José Eleutério Júnior, pela atenção, pelos ensinamentos, pela orientação contribuindo no desenvolvimento desse estudo.

A professora Dra. Márcia Valéria Pitombeira, pelos ensinamentos, orientação na leitura dos resultados citológicos.

A professora Dra. Rita de Cássia Carvalho Barbosa, pela presteza em aceitar o convite, pela cuidadosa leitura e pelas valiosas contribuições.

Maternidade Escola Assis Chateaubrian – MEAC, representada pela direção, pelos médicos, pelas atendentes e funcionários, pelo carinho e atenção, e por nos permitir o acesso para a execução desse estudo.

Ao Departamento de Patologia e Medicina Legal representado pelos professores e demais funcionários pelo empenho na formação científica dos pós-graduandos.

A minha AMIGA querida e mestranda Tatiana Dantas Rodrigues, pela sua amizade, pelo seu carinho, pelas horas de estudo compartilhado, pelas gargalhas descontraídas, pela valiosa contribuição no desenvolvimento dessa pesquisa.

A doutoranda Markênia Kélia Santos Alves, por sua alegria, por ser carinho e pela valiosa contribuição no desenvolvimento e correção desse estudo.

Ao doutorando Isaac Farias Cansanção, pela valiosa contribuição na correção do estudo e na disposição para ajudar sempre.

A doutoranda Débora Menezes da Costa, pela valiosa contribuição nas análises estatísticas do estudo, bem como pela sua amizade e doçura.

A doutoranda Isabelle J.L. Silva Fernandes, pela sua atenção, carinho, companheirismo e amizade.

A doutoranda Ana Paula Santos do Carmo, pela sua amizade e sua grande disposição para ajudar.

As MINHAS queridas alunas de Iniciação Científica, Gedeanne Taveira e Lia Pinto, por disponibilizar parte de seu tempo para ajudar na execução desse trabalho, bem como pela sua dedicação a pesquisa e sua amizade.

A todos os amigos do Laboratório de Genética Molecular – LABGEM - Emanuelle, Apollo, Marcus, Naiane, Francivândi, Leidiane, Maira pelo apoio, pela a agradável convivência, pela amizade e por aguentar os toques incansáveis dos meus alarmes horários.

A todos os meus milhares de AMIGOS, estudantes ou não, enfermeiros ou não, pela força incondicional nos momentos mais difíceis dessa jornada.

A todos os funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC, em especial as funcionárias Débora Calvacante, Clícia, Maria do Céu e a estagiária Graziela Cavalcante, pela presteza, atenção e dedicação as atividades científicas desse departamento.

“Hoje estou certa de que nós somos os senhores do nosso destino, de que a tarefa que foi colocada diante de nós não está acima das nossas forças; de que nossas dores e provações não estão acima da nossa resistência. Enquanto tivermos fé na nossa causa e um desejo indestrutível de vencer, a vitória não nos será negada...”
(Winston Churchill)

RESUMO

O câncer de colo uterino se inicia com a progressão de lesões pré-malignas conhecidas como Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC). Algumas evidências têm sugerido a participação do Papilomavírus Humano (HPV) nesse processo. A infecção viral induz a expressão de marcadores, que possuem relação direta com o processo neoplásico, podendo ser usado como ferramenta complementar para o diagnóstico. Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo associar à presença do HPV com a expressão das proteínas Ki-67 e MYC em pacientes portadoras de NIC. O estudo contou com 173 pacientes, atendidas nos ambulatórios de Patologia Cervical da MEAC. Em todas, as lesões suspeitas foram biopsiadas e encaminhadas para o laboratório de patologia da UFC para estudo histopatológico. Os tecidos biopsiados foram submetidos à hibridação *in situ*, para detecção de HPV pelo método GenPoint®, e à imunohistoquímica, para identificação das proteínas celulares Ki-67 e MYC, através do método da estreptoavidina-biotina-peroxidase. As pacientes tinham idade de 14 a 54 anos (mediana de 30 anos). A análise histopatológica revelou, para o diagnóstico de NIC, que 41%, eram NIC I, 24,9% NIC II e 34,1% NIC III. Considerando a faixa etária, encontrou-se correlação positiva quando associada com o grau de NIC ($p = 0,001$), estando a maior frequência de NIC III nas pacientes com idade de 31 a 40 anos. A presença de HPV foi detectada em 17,3% dos casos. O marcador de proliferação celular Ki-67 foi positivo em 80,3% das amostras. A positividade desse marcador foi de 40,3% em paciente com NIC I, 26,6% com NIC II e 33,1% com NIC III. Considerando a presença de HPV, observou-se que 100% dos casos foram positivos para o marcador Ki-67 ($p = 0,000$). A análise da expressão nuclear da proteína MYC identificou positividade em 61,8% dos casos. Entre as pacientes com o diagnóstico para NIC, pode-se observar que foi positivo para o marcador MYC, 42% em paciente com NIC I, 26,2 % com NIC II e 31,8% com NIC III. A presença de HPV foi identificada em 83,3% no caso de MYC positivo, mostrando uma correlação positiva ($p = 0,007$). As análises do Ki-67 mostrou que o índice de proliferação celular pode ser o diferencial entre os graus da lesão. Observou-se ainda, que a desregulação de MYC parece ser um evento inicial e independente da presença do HPV, e que a concomitantemente expressão do MYC e do Ki-67 podem estar associadas com a severidade das lesões na presença do vírus. Esse achados pode ser utilizado como importante instrumento na avaliação das lesões precursoras do câncer do colo uterino, favorendo com um bom prognóstico no aparecimento precoce das lesões.

Palavras-chave: Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC). Papilomavírus Humano (HPV). Ki-67. MYC. Marcadores Moleculares.

ABSTRACT

Cervical cancer begins with the progression of premalignant lesions known as cervical intraepithelial neoplasia (CIN). Some evidence has suggested the involvement of the Human Papillomavirus (HPV) in the process. The viral infection induces the expression of markers that have a direct relationship with the neoplastic process and may be used as an additional tool for the diagnosis. In this context, this study aims to associate the presence of HPV with the expression of Ki-67 and MYC protein in women with CIN patients. The study included 173 patients treated in clinics of the MEAC Cervical Pathology. In all, the suspicious lesions were biopsied and sent to the pathology laboratory of the UFC for histopathology. The biopsied tissue was subjected to in situ hybridisation for HPV detection by GenPoint® method and immunohistochemistry for the identification of cellular proteins Ki-67 and MYC through the streptavidin-biotin-peroxidase method. The patients were aged 14-54 years (median 30 years). Histopathological analysis revealed, for the diagnosis of CIN, 41% were CIN I, 24.9% CIN II and CIN III 34.1%. Considering the age group, there was a positive correlation when combined with the degree of NIC ($p = 0.001$), the highest frequency of CIN III in patients aged 31-40 years. The presence of HPV was detected in 17.3% of cases. The cell proliferation marker Ki-67 was positive in 80.3% of samples. The positivity of this marker was 40.3% in patients with CIN I, 26.6% with CIN II and CIN III with 33.1%. Whereas the presence of HPV, it was observed that 100% of cases were positive for Ki-67 score ($p = 0.000$). Analysis of the nuclear expression of MYC protein identified positive in 61.8% of cases. Among the patients with a diagnosis of CIN, it can be observed that it was positive for the marker MYC, 42% in patients with CIN I to CIN II 26.2% and 31.8% with CIN III. The presence of HPV was found in 83.3% in the case of a positive MYC, showing a positive correlation ($p = 0.007$). The analysis of Ki-67 showed that the cell proliferation index can be the difference between degrees of injury. It was also observed that the MYC dysregulation appears to be an early and independent of the presence of HPV event and concomitantly the expression of MYC and Ki-67 may be associated with the severity of the lesions in the presence of the virus. These findings can be used as an important tool in the evaluation of precursor lesions of cervical cancer, favorendo with a good prognóstico in the early appearance of the lesions.

Keywords: Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN). Human Papillomavirus (HPV). Ki-67. MYC. Molecular Markers.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Gêneros, Espécies e Genótipos do HPV.....	19
TABELA 2	Classificação dos HPVs quanto ao tropismo e a categoria de risco.....	20
TABELA 3	Função dos genes das regiões E (precoce) e L (tardia) do vírus.....	23
TABELA 4	Métodos dos testes para alvos DNA ou RNA HPV.....	29
TABELA 5	Estimativas para o ano de 2012 do número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária - Região Nordeste.....	32

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Mapa genético do HPV.....	22
FIGURA 2	Mecanismo molecular de inativação das proteínas do ciclo celular	26
FIGURA 3	Representação espacial das taxas brutas de incidência do câncer de colo uterino	31
FIGURA 4	Representação da região anatômica do útero.....	33
FIGURA 5	Representação da região anatômica transversal do útero e da região frontal da cérvix vaginal.....	34
FIGURA 6	Imagem colposcópica do colo uterino com regiões normal e com regiões alterada.....	35
FIGURA 7	Processo de infecção do HPV.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARF	<i>Alternative Reading Frame</i>
ASC-US	<i>Atypical squamous cells of undetermined significance</i>
CA	Câncer
CDC	<i>Centers for Disease Controls and Prevention</i>
CH	Captura Híbrida
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EUA	Estados Unidos da América
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
HPV	Papilomavírus Humano
HSIL	<i>High-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>
IARC	Agência Internacional para pesquisa do Câncer
IHQ	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
JEC	Junção Escamocolumnar
LCR	<i>Long Control Region</i>
LI	<i>Labelling Index</i>
LSIL	<i>Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>
LZ	<i>Leucine Zipper</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLH	<i>Helix-Loop-Helix</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>

MDM2	<i>Mouse Double Minute 2</i>
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open Read Frame</i>
ORI	<i>Origen of Replication</i>
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
Rb	Retinoblastoma
SNP	<i>Simple Nucleotids Polimorphisms</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
URR	<i>Upstream Regulatory Region</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
ZT	Zona de transformação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV).....	17
1.1.1. Histórico.....	17
1.1.2. Característica dos Papilomavírus Humano.....	18
1.1.3. Papel das proteínas do HPV.....	23
1.1.4. HPV e o Câncer do Colo Uterino.....	27
1.1.5. Métodos de detecção do HPV.....	28
1.2. CÂNCER DO COLO UTERINO.....	30
1.2.1. Epidemiologia do Câncer do Colo Uterino.....	30
1.2.2. Características Clínicas e Histopatológicas do Câncer do Colo Uterino.....	32
1.2.3. Etiologia do Câncer do Colo Uterino.....	37
1.3. MARCADORES MOLECULARES.....	38
1.3.1. Proteína Ki-67.....	38
1.3.2. Proteína MYC.....	39
1.4. PERGUNTA DE PARTIDA.....	41
1.5. HIPÓTESE DO TRABALHO.....	41
2. OBJETIVOS.....	41
2.1. OBJETIVO GERAL.....	41
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
REFERÊNCIAS	42
ARTIGO.....	50
ANEXOS.....	69
Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética.....	69

APÊNDICES.....	70
Apêndice 1 – Materiais e Métodos.....	70
Apêndice 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.....	74
Apêndice 3 – Declaração para retirada de blocos.....	77
Apêndice 4 – Tabelas Complementares.....	78
Apêndice 5 – Gráficos Complementares.....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. *PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)*

1.1.1. HISTÓRICO

As lesões verrucosas e papilomatosas que comprometem a pele vêm sendo descritas desde a antiguidade. Os estudos greco-romanos já relatavam o surgimento desse tipo de lesões cutâneas, porém não conseguiam diferenciá-las das sífilíticas e das gonorréicas. Nesse mesmo período, já se evidenciava a possibilidade de o contágio ser sexual, visto que estavam presentes em indivíduos de comportamento homossexual, incestuoso ou promíscuo (DAS DORES, 2005).

No período entre 1760 a 1839, o médico italiano Rigoni-Stern verificou o aumento de câncer de colo uterino em mulheres casadas, viúvas e prostitutas e raros em virgens e freiras, sendo esse trabalho, que foi publicado em 1842, feito a partir do estudo com obituários dessas mulheres em Verona (ZUR HANSEN, 2009).

No começo do século XX, as intensas mudanças sociais, o surgimento e a difusão dos anticoncepcionais hormonais orais propiciaram maior liberdade sexual, acarretando um aumento significativo na incidência das doenças sexualmente transmissível (DSTs), o que favoreceu o interesse clínico em estudá-las. Durante mais de um século, pesquisadores procuraram, sem sucesso, determinar o agente causador dessas lesões e sua relação com câncer de colo uterino (DORES, 2005; KING *et al.*, 2009).

A falta de evidências, que comprovassem a verdadeira etiologia do câncer de colo uterino, estimulou novas pesquisas. O agente causador das verrugas em humanos foi caracterizado pela primeira vez em 1907 por Ciuffo, porém, somente em 1933 foi isolado o vírus Papilomavírus Humano (HPV) por Richard Shope (PALO *et al.*, 1996).

Achados históricos publicados em alguns estudos científicos mencionam que a associação do vírus HPV com o câncer de colo uterino vem acontecendo desde 1949. Nessa época o médico patologista George Papanicolaou identificou alterações celulares pré-malignas em algumas mulheres. Nesse mesmo período, Strauss e Swan (1949) visualizaram o vírus através de microscopia eletrônica em amostras de verrugas cutâneas e, posteriormente, em amostras de verrugas genitais (ALMEIDA *et al.*, 1969; NAKAGAWA *et al.*, 2010; MULLER & MAZIERO, 2010.)

A confirmação de que o HPV era um agente de transmissão sexual, somente aconteceu em 1954. Nessa época, esposas de soldados, os quais haviam voltado da guerra da Coréia,

passaram a desenvolver lesões cutâneas genital em um período de quatro a seis semanas após o reencontro, mesmo período em que eles também apresentavam lesões penianas, relacionando o aparecimento das lesões com a exposição ao agente (DAS DORES, 2005).

O interesse pelas descobertas acerca do vírus só aumentou nos anos subsequentes, consequentemente pode-se identificar os primeiros tipos de HPV e, no final da década de 70, o primeiro acordo de classificação dos Papilomavírus foi estabelecido em um *workshop* (SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 2008).

Na década de 80, os HPVs de alto risco foram identificados e passaram a ser considerados oncogênicos pela sua relação com o câncer de colo uterino. Por volta de 1987, o primeiro estudo epidemiológico sobre HPV e câncer foi publicado. A partir de então, vários estudos epidemiológicos e moleculares confirmam ser a infecção do colo uterino, por diferentes tipos de HPVs, o evento precursor na gênese dessa neoplasia. (SYRJÄNEN *et al.*, 1988; SILVA *et al.*, 2002; TORNESELLO *et al.*, 2010; LETO *et al.*, 2011).

Ao longo desses anos, várias pesquisas estão sendo conduzidas no intuito de compreender a patogênese molecular dos HPVs visto sua importância para o rastreamento, diagnóstico, tratamento e prevenção das infecções relacionadas a esse vírus.

1.1.2. CARACTERÍSTICAS DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

O HPV é um vírus considerado pequeno, não envelopado, com formato icosaédrico, apresentando um diâmetro de 52 a 55 nm. Suas partículas virais tem uma única molécula de DNA circular de dupla hélice, de aproximadamente 8000 pb, contida numa proteína esférica circundada por um capsídeo, formado por 72 capsômeros pentaméricos. O capsídeo viral é formado por duas proteínas estruturais conhecida como L1 (proteína do capsídeo maior), de 55 kD de tamanho, a qual representa 80% do capsídeo viral e a L2 (proteína do capsídeo menor) com peso molecular de 70kD (HOWLEY & LOWY, 2001; DE VILLIERS *et al.*, 2004; SCHEURER *et al.*, 2005; FERRARO *et al.*, 2011).

Os papilomavírus se enquadravam anteriormente na família *Papovaviridae*. Devido às expressivas diferenças genéticas e estruturais, os HPVs passaram a pertencer a uma nova família *Papillomaviridae* que estava dividida em 16 gêneros (alfa, beta, gama, delta, epsilon, zeta, eta, theta, iota, kappa, lambda, mu, nu, xi, omikron, pi). No entanto, os papilomavírus humano encontravam-se distribuídos em apenas cinco gêneros: alfa (com 15 espécies), beta (com 5 espécies), gama (com 5 espécies), Mu (com 2 espécies) e Nu (com 1 espécie), podendo cada

espécie ainda apresentar genótipos virais distintos, conforme apresentado na tabela 1 (DE VILLIERS *et al.*, 2004).

TABELA 1 - Gêneros, Espécies e Genótipos do HPV.

Gênero	Espécie	Genótipos	Comentários
Alfa	1	HPV-32, 42	Mais frequente em lesões benignas da mucosa oral ou genital (baixo risco).
	2	HPV-10, 3, 28, 29, 78, 94	Mais comum em lesões cutâneas do que em mucosas (baixo risco).
	3	HPV-61, 72, 81, 83, 84, 62*, 86*, 87*, 89*	Lesões em mucosas (baixo risco)
	4	HPV-2, 27, 57	Verrugas cutâneas. Frequente em lesões genitais benignas em crianças.
	5	HPV-26, 51, 69, 82	Lesões de alto risco em mucosas. Eventualmente em lesões benignas.
	6	HPV-53, 30, 56, 66	
	7	HPV-18, 39, 45, 59, 68, 70, 85*,	Lesões de alto risco em mucosas.
	8	HPV-7, 40, 43, 91*	Lesões cutâneas e mucosas de baixo risco. HPV-7 também conhecido como " <i>butcher's wart virus</i> ", geralmente em lesões de pele e mucosa de pacientes HIV(+).
	9	HPV-16, 31, 33, 35, 52, 58, 67,	Lesões malignas de mucosa (alto risco)
	10	HPV-6, 11, 13, 44, 74, PcPV	Mais associado com lesões benignas da mucosa (baixo risco). Relatos de HPV-6 em carcinoma verrucoso.
	11	HPV-34, 73	Lesões de mucosa (alto risco).
	12	RhPV	Lesões de mucosa genital em macacos Rhesus
	13	HPV-54	
	14	HPV-90*	Mucosa (baixo risco)
	15	HPV-71	
Beta	1	HPV-5, 8, 12, 14, 19, 20, 21, 25, 36, 47, 93*	Mais frequente em lesões cutâneas, contudo, há relatos de DNA detectados em mucosa.
	2	HPV-9, 15, 17, 22, 23, 37, 38, 80	Comumente associado com Epidermodisplasia verruciforme e pacientes imunossuprimidos. Mais frequente em lesões benignas, embora, haja relatos em lesões malignas, também em imunocompetentes.
	3	HPV-49, 75, 76	Lesões cutâneas benignas
	4	HPV-92*	Lesões pré-malignas e malignas
	5	HPV-96*	
Gama	1	HPV-4, 65, 95	Lesões cutâneas. Presença de corpos de inclusão intracitoplasmáticos homogêneos a nível histológico.
	2	HPV-48	Lesões cutâneas
	3	HPV-50	
	4	HPV-60	

	5	HPV-88	
Mu	1	HPV-1	Presença de corpos de inclusão intracitoplasmáticos heterogêneos a nível histológico.
	2	HPV-63	Presença de corpos de inclusão intracitoplasmáticos filamentosos a nível histológico.
Nu	1	HPV-41	Lesões cutâneas benignas e malignas

* Gêneros, Espécie e Genótipos de HPV. Adaptado de DE VILLIERS *et al.*, 2004.

Atualmente, existem mais de 100 tipos de HPVs patogênicos aos seres humanos, que foram descobertos devido ao sequenciamento de seus genomas. Dentre esses, pelo menos 40 tipos diferentes estão relacionados ao desenvolvimento do câncer (GHITTONI *et al.*, 2010). De acordo com o exposto na Tabela 2, esses vírus podem ser divididos, considerando o risco oncogênico, em alto e em baixo risco, e de acordo com o tropismo, em cutaneotrópicos (infectam a epiderme) e em mucosotrópico (infectam a mucosa em geral) (PASSOS *et al.*, 2008; ZUR HAUSEN, 2009; MONTALVO *et al.*, 2011).

Dentre essa diversidade viral existe quinze tipos de HPVs que são considerados de alto risco e podem estar diretamente associado ao desenvolvimento de neoplasia de colo uterino, entre eles estão os que possuem genótipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82, além destes, três outros são considerados prováveis tipos de alto risco, HPV-26, 53 e 66 (GARCIA-ESPINOSA *et al.*, 2012).

Mesmo assim, algumas neoplasias estão sendo atribuída aos vírus com baixo risco oncogênico, comumente encontrados em lesões consideradas benignas, como papilomas e verrugas simples. Já aqueles de alto risco, estão associados a diferentes graus de lesões escamosas intraepiteliais do colo uterino, da vagina, da vulva, do pênis, do ânus e de cabeça e pescoço (Tabela 2) (SILVA *et al.*, 2002; PASSOS *et al.*, 2008).

TABELA 2 - Classificação dos HPVs quanto ao tropismo e a categoria de risco para o desenvolvimento de neoplasias, incluindo exemplos de lesões virais em cada classe.

CLASSIFICAÇÃO	CATEGORIA	GENÓTIPOS HPV	NATUREZA LESÃO	LESÃO
Tropismo	Cutaneotrópico	1 e 3	Benigna	Verrugas
		5 e 8	Maligna	CA de pele
	Mucosotrópico	6, 11 e 42	Benigna	Condilomas
		16, 18, 31 e 45	Maligna	CA cervical
Risco Oncogênico	Baixo risco	6, 11, 26, 42, 44, 54, 70 e 73	Benigna	Condilomas
	Alto risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45,	Maligna	CA cervical

Adaptado de SILVA *et al.*, 2002.

A infecção pelo HPV está relacionada à especificidade de seus hospedeiros. Esse vírus é conhecido por infectar tecidos epiteliais de anfíbios, de répteis, de pássaros e de mamíferos, tendo, preferencialmente, ciclo de vida latente, visto que já foi identificado alguns tipos diferentes em locais aleatórios da pele saudável de humanos e de animais (DE VILLIERS *et al.*, 2004; CHOW *et al.*, 2010).

A origem do câncer do colo uterino vem sendo estudada há muito tempo e tem sido associada as alterações citológicas do epitélio escamoso na zona de transformação (ZT). Além disso, células cilíndricas ou de reserva, também vêm sendo consideradas alvos de infecção, mas a ampla distribuição topográfica desses tipos de célula, não é suficiente para justificar o seu papel oncogênico. No entanto, as mudanças contínuas que acontecem nessa zona, durante toda a vida da mulher, pode caracterizar a especificidade dessa região e isso pode favorecer o aparecimento de lesões (GHITTONI *et al.*, 2010; HERFS *et al.*, 2012).

A invasão pelo patógeno se inicia nas células da camada basal do epitélio, em decorrência de abrasão e de micro-lesões da pele e da mucosa. A replicação viral ocorre a nível nuclear na célula hospedeira (DA ROSA *et al.*, 2009). Ainda não está comprovado quais receptores que estão envolvidos na ligação que facilitam a penetração do vírus em tais células, no entanto se cogita a atuação da integrina alfa-6-beta-4 ($\alpha 6\beta 4$), cuja expressão é relativamente restrita a células epiteliais, mesenquimais e algumas células neuronais (CHOW *et al.*, 2010).

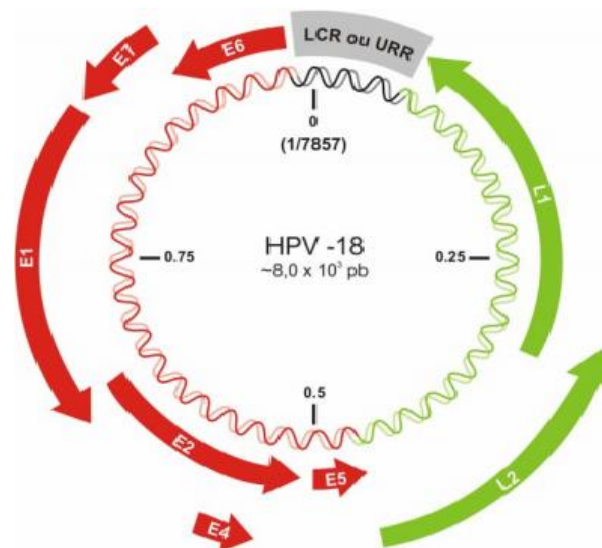
Quanto à infecção, sabe-se que as partículas virais se ligam à superfície da célula hospedeira e induzem a internalização em vacúolos citoplasmáticos, seguido da liberação das mesmas no citoplasma onde, provavelmente, as proteínas que constituem o capsídeo são degradadas e, subsequentemente, o genoma viral é conduzido ao núcleo, permanecendo na forma episomal, não integrado ao genoma do hospedeiro ou na forma integrada, em que o DNA do vírus está fusionado ao DNA do hospedeiro. A produção de vírions fica restrita às células epiteliais suprabasais maduras, nas quais todos os genes do vírus são expressos permitindo a multiplicação do genoma viral, a síntese de proteínas, a montagem e a liberação dos vírions nas células epiteliais superficiais esfoliadas (BAGARELLI & OLIANI, 2004; CHOW *et al.*, 2010; FERRARO *et al.*, 2011).

A genotipagem é, atualmente, o método mais viável para identificação das diversas categorias de papilomavírus. Esse processo ocorre pela determinação da sequência de

nucleotídeos que compreendem os genes *L1*, *E6* e *E7*, que perfazem cerca de 30% do genoma viral. Divergência no genoma inferior a 2%, o vírus em estudo é considerado como uma variante do mesmo tipo. Se a divergência na sequência de DNA estiver entre 2 a 10%, outro subtipo viral foi identificado e caso essa divergência seja superior a 10% trata-se de um novo tipo de HPV. Esse método foi então escolhido devido às dificuldades no estabelecimento de sistemas de cultura *in vitro* do vírus, que impediram os pesquisadores de instituir um sistema de classificação sorológica (SILVA *et al.*, 2002; DE VILLIERS *et al.*, 2004).

Conforme esquematizado no mapa genético do HPV (Figura 1), existem três regiões distintas identificadas no genoma viral, as quais estão relacionadas com a codificação de proteínas virais, que são: a) URR (do inglês, *Upstream Regulatory Region*), também conhecida como Região Longa de Controle - LCR (do inglês, *Long Control Region*), é uma região não codificante do genoma viral de cerca de 400 a 900 pb que, em geral, desempenha funções regulatórias como o próprio nome sugere, esta região contém a origem da replicação (ORI), promotores precoces e sítios de ligação para fatores de transcrição e proteínas reguladoras; b) Região Precoce (do inglês, *early region*), que contém seis ou mais ORFs (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), envolvidos na transativação gênica, replicação, transformação e adaptação viral aos diferentes ambientes celulares; c) Região Tardia (do inglês, *late region*), que contém dois ORFs (do inglês, *Open Reading Frame*) codificadores das proteínas tardias L1 e L2, as quais se unem para formar a estrutura do capsídeo (BURK *et al.*, 1996; GHITTONI *et al.*, 2010; GARCÍA-TAMAYO *et al.*, 2010).

FIGURA 1 - Mapa genético do HPV.



Diferente de outros vír Adaptado de SILVA *et al.*, 2002.

HPV apresenta ORFs,

de forma que a transcrição ocorre apenas num sentido, da esquerda para a direita, quando se toma como referência o mapa linear convencional ou sentido horário no mapa circular. Considerando os promotores, o genoma viral pode apresentar até quatro deles (P1, P2, P3, P4), sendo que todos os genótipos do HPV apresentam pelo menos dois promotores principais: P1 (ou P97), localizado imediatamente a montante do gene E6, e o P2 (ou P670), localizado dentro do gene E7 (BURK et al., 1996). Estudos mencionam que o genótipo dos HPVs é estático e mudanças na sua sequência por mutação ou por recombinação são eventos raros, podendo acontecer em uma frequência semelhante à que ocorre no genoma da célula infectada (LETO *et al.*, 2011).

1.1.3. PAPEL DAS PROTEÍNAS DO HPV

A tumorigenicidade é induzida por alterações no DNA, sendo uma delas a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, a qual necessita, além de sinais celulares, de agentes ligantes e de receptores membranais, que iniciem a ativação de uma cascata de eventos controladora do ciclo celular. Os genes, da região precoce e da região tardia do HPV, têm grande importância nesse processo, visto que cada um desenvolve uma função específica a partir dos seus produtos finais (Tabela 3), no intuito de transformar e de imortalizar a célula lesada (SILVA *et al.*, 2002; SICHERO *et al.*, 2012).

A região tardia codifica proteínas virais estruturais (L1- L2), que são importantes na formação do capsídeo. A região precoce é importante na regulação da replicação viral, codificando predominantemente proteínas virais (E1-E7) que são importantes nesse processo (BAAK *et al.*, 2006).

TABELA 3 - Função dos genes das regiões E (precoce) e L (tardia) do vírus.

GENES		FUNÇÃO
Precoce	<i>E1</i>	Replicação do DNA viral
	<i>E2</i>	Controle da transcrição
	<i>E4</i>	Maturação do vírus e alteração da matriz intracelular
	<i>E5, E6 e E7</i>	Estímulo da proliferação e transformação celular
Tardio	<i>L1</i>	Codifica proteína principal do capsídeo
	<i>L2</i>	Codifica proteína secundária do capsídeo

Adaptado de SILVA *et al.*, 2002.

Após a infecção viral, os primeiros genes expressos são *E1* e *E2*, cujos produtos estão

envolvidos na replicação do genoma viral. Esses genes agem independentemente dos sítios de ligação, na origem de replicação do papilomavírus, porém poderá ocorrer à interação das proteínas transcritas por eles, E1 e E2 respectivamente, formando um complexo multimérico (SOUTO *et al.*, 2005).

O complexo multimérico de proteínas está vinculado à origem da replicação viral, ao recrutamento de proteínas, à regulação da expressão do genoma viral e à manutenção da forma episomal do vírus. Além disso, essas proteínas também regulam um número estável de 20 a 100 cópias do DNA do HPV na célula (LONGWORTH & LAMINS, 2004; FERRARO *et al.*, 2011).

A proteína E2 também está envolvida na separação do genoma do vírus durante a divisão celular e na promoção da montagem dos vírions, tendo ainda a capacidade de reprimir a atividade do promotor E6/E7. Dessa forma, pode-se afirmar que a transcrição de E1 e E2 causa repressão de E6 e E7, permitindo a função de supressão tumoral da proteína p53 e da proteína retinoblastoma (Rb), mantendo a homeostase epitelial. O contrário poderá causar uma diminuição desses fatores celulares em virtude da presença aumentada das proteínas E6 e E7 (MCMURRAY *et al.*, 2001).

A ORF4 do papilomavírus, mesmo se localizando na região precoce do genoma do vírus, expressa o gene de forma tardia e tem um papel importante na infecção. Normalmente, a sequência do gene *E4* não se encontra conservado no HPV. A proteína E4 é expressa primeiramente em epitélio em diferenciação, como também em células onde o DNA viral é replicado de forma vegetativa. Apesar de E4 ser encontrada em altos níveis em tecidos infectados, sua função não é exatamente conhecida. O *E4* sobrepõe-se com o ORF E2 em um esquadro de leitura diferente e, portanto, codifica uma proteína totalmente diferente. O transcrito viral é formado através de *splicing*, incluindo poucos códons do começo da E1 continuando para o E4 (FERRARO *et al.*, 2011).

A E5 é uma proteína constituída de 83 aminoácidos, associada a membranas intracelulares. Estudos mostram que, em células transformadas, essa proteína forma um homodímero localizado no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático (RAPAPORT, 2005). Tem-se proposto que a E5 pode se ligar diretamente ao EGFR potencializando a sinalização induzida por este receptor incluindo a atividade da proteína-quinase ativada por mitógeno (MAPK) (HEBNER & LAIMINS, 2006).

Apesar de algumas propriedades conhecidas, o papel desta proteína no ciclo de vida do HPV, ainda não está claro. Mesmo assim, a E5 não é expressa em carcinomas do colo uterino, visto que a sequência que a codifica está frequentemente deletada, indicando a ausência de um papel essencial deste gene em manter o fenótipo maligno em células transformadas, devendo

essa proteína contribuir apenas para as etapas iniciais da carcinogênese (CHOW *et al.*, 2010).

Os efeitos dos produtos dos genes *E6* e *E7* têm sido intensamente estudados. Esses dois genes virais estão sempre presentes e superexpresso no carcinoma do colo uterino, contribuindo, portanto, com o início e a manutenção do fenótipo tumoral. O gene *E6* é um dos primeiros expressos na infecção do HPV, possuindo um papel importante na imortalização celular, embora que sozinho não seja capaz de realizar tal função, sendo necessário atuar juntamente com o gene *E7* na indução de mudanças no comportamento celular (HOWIE *et al.*, 2009; GHITTONI *et al.*, 2010).

A proteína E6 se insere em uma categoria de proteína que não possui atividade enzimática intrínseca, utilizando de interação com proteínas celulares para que possa exercer suas funções. É uma proteína pequena, com mais de 150 aminoácidos. Pode ser encontrada tanto no núcleo, quanto no citoplasma de queratinócitos infectados e tem um importante fator na progressão do câncer, visto que possui ação antiapoptótica e carcinogênica. A principal característica estrutural, que favorece sua atuação, é a presença de dois domínios atípicos de zinco com duas cisteínas (Cis-Cis-XX). Tal característica é conservada em todas as proteínas E6 de todos os tipos de HPV (GHITTONI *et al.*, 2010).

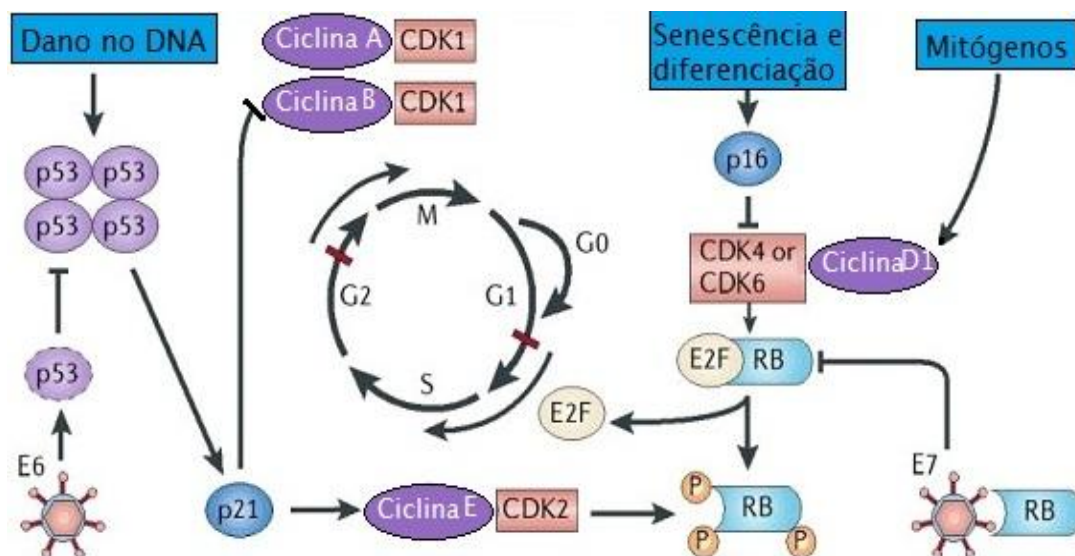
A propriedade mais relevante da E6 de HPVs, principalmente os de alto risco, é a afinidade a um componente da família U_{E3} de ubiquitina ligase, denominado E6-AP (do inglês, *E6-associated protein ligase*). Esse fenômeno forma um complexo trimérico com a proteína p53, promovendo a degradação proteolítica desta última através da via da ubiquitina, com redução dos níveis de p53 na célula e impedindo suas atividades regulatórias sobre o ciclo celular. Para o agente infeccioso, este efeito pode aliviar as restrições na síntese de DNA, permitindo sua replicação (HEBNER & LAIMINS, 2006; HOWIE *et al.*, 2009).

Estudos demonstram que a indução da degradação de p53 parece ser uma propriedade exclusiva da E6 principalmente em genótipos de alto risco. No entanto o bloqueio da função da proteína p53, através desse mecanismo, deve ter um papel importante na carcinogênese, comumente comprovada em outras neoplasias malignas em que o gene *TP53* mostra-se frequentemente mutado (GHITTONI *et al.*, 2010).

A oncoproteína viral E7, assim como a E6, também atua como um importante fator de progressão tumoral. É uma proteína nuclear, que contém aproximadamente 100 aminoácidos. A sua atividade inicial acontece com a associação do gene do retinoblastoma (*RB*). O *RB* é um gene supressor tumoral importante no controle negativo do ciclo celular, haja vista que regula o ciclo promovendo a transcrição da fase G1 a S (SILVA *et al.*, 2002; GHITTONI *et al.*, 2010). Sob regulação do ciclo celular normal, a proteína Rb é fosforilada durante a fase S, mediada por

quinase dependente de ciclina (CDK). A Rb se liga ao fator de transcrição E2F reprimindo a transcrição de genes necessários à síntese de DNA, os quais são transcritos de maneira dependente do ciclo celular e diretamente regulados pelo E2F (Figura 2) (RAPAPORT, 2005). Dessa forma, conforme esquematizado na figura 2, na presença das proteínas virais, a Rb fosforilada é impedida pela proteína E7 de se ligar a E2F, permitindo assim que o fator de transcrição promova a continuidade do ciclo celular de células epiteliais já diferenciadas, favorecendo a replicação de genes do HPV (MCMURRAY *et al.*, 2001).

FIGURA 2 - Mecanismo molecular de inativação das proteínas do ciclo celular pelas proteínas virais.



Adaptado de SILVA *et al.*, 2002.

Além disso, a proteína E7 induz a degradação da Rb através da ubiquitina. Ainda assim, estudos mostram que a atuação da proteína E7 de HPV de alto risco é bastante interessante, pois a proteína tem a capacidade dez vezes maior de se ligar ao Rb do que as proteínas E7 dos de baixo-risco mostrando, assim, diferenças na eficiência de ligação ao sítio de Rb e isso se dá devido a mudança de um único aminoácido (RAPAPORT, 2005).

A maioria dos autores concordam que os efeitos da E6 e da E7 sobre os dois principais supressores tumorais p53 e pRb, respectivamente, respondem pelo potencial oncogênico dos genótipos de alto risco de HPV, sendo funcionalmente equivalentes a mutações observadas em diversos tumores. Esse sinergismo parece ser determinante, pois a expressão de E7 na ausência

de E6 resulta num aumento do nível de p53, provavelmente, decorrente da ativação do p19^{ARF} induzido pelo E2F1 que, por sua vez, interfere na atividade do MDM2, culminando no aumento do nível de p53. De forma que, a E6 se mostra indispensável para evitar os estímulos de parada do ciclo celular ou apoptótico advindos da p53 (PIM & BANKS, 2010).

1.1.4. HPV E O CÂNCER DO COLO UTERINO

Pesquisas sobre o ciclo de vida do HPV e o seu papel no desenvolvimento do câncer de colo uterino foi ampliado drasticamente nos últimos anos com o avanço das técnicas de biologia molecular. Harald zur Hausen, na Alemanha foi quem primeiro identificou segmentos de DNA viral em carcinomas de colo uterino, possibilitando o entendimento que se tem hoje sobre o binômio câncer de colo uterino e HPV, este estudo o fez merecedor do prêmio Nobel de Medicina em 2009 (DA ROSA *et al.*, 2009; GARCÍA-TAMAYO *et al.*, 2010; BRAGAGNOLO *et al.*, 2010).

O vasto conhecimento adquirido com a etiopatogenia da infecção viral permitiu a identificação de genes virais, que tem um papel fundamental na oncogênese cervical. Acredita-se que a presença do vírus por si só não é suficiente para induzir a carcinogênese, no entanto representa um fator indispensável para o desenvolvimento desta doença. Outros fatores são importantes para a progressão das lesões neoplásicas, além da presença de vírus, a carga viral, a infecção persistente, a imunossupressão, o tabagismo, a presença de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), a promiscuidade, bem como fatores genéticos que podem impedir a supressão ou eliminação da infecção do HPV pelo sistema imunológico, evitando transformações neoplásicas (LI *et al.*, 2010; ABREU *et al.*, 2012).

O processo infeccioso é responsável pelo aparecimento de lesões pré-malignas do carcinoma de células escamosas do colo uterino classificadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como NIC, que ao longo do tempo atua de forma dinâmica podendo persistir inalterada, regredir ao normal ou ao menor grau de NIC, ou progredir para uma lesão de maior gravidade, podendo chegar a carcinoma invasivo. Períodos prolongados em contato com o vírus está claramente relacionado com a transformação neoplásica e é, portanto, clinicamente relevante para um diagnóstico de câncer do colo uterino O valor dessa persistência pode ser usado como um marcador clínico da doença, sugerindo o teste de DNA do vírus como ferramenta para programas de rastreamento, quando se observa uma progressão do grau da doença e a infecção recorrente ((DUGGAN, 2002; KOSHIOL *et al.*, 2008; ULEBERG *et al.*,

2011; SASLOW *et al.*, 2012).

Acredita-se ainda que o DNA viral se integre aleatoriamente ao genoma do hospedeiro durante o processo de reparo que é desencadeado após o surgimento de quebras na dupla fita de DNA do genoma celular. A forma integrada é um indicador de instabilidade genômica encontrada frequentemente em amostras de câncer de colo uterino. Além da identificação viral, a utilização de biomarcadores funcionais, como Ki-67 e MYC, tem provado ser útil na previsão, na progressão e na regressão da doença, visto que tanto podem ser utilizados como sinalizadores da carcinogênese como também indicadores da agressividade da doença (TERMINI & VILLA, 2008; ULEBERG *et al.*, 2011).

1.1.5. MÉTODO DE DETECÇÃO DO HPV

O diagnóstico morfológico de alterações associadas a infecções causadas por HPV ainda é amplamente utilizado, tanto em esfregaços celulares quanto em cortes de tecidos. Embora a presença de colócitos possa acontecer, sugerindo uma infecção produtiva por este vírus, a introdução das técnicas de detecção dos genomas virais vem favorecer a precisão do diagnóstico (SILVA FILHO & LOGATTO FILHO, 2000).

Essas técnicas que são utilizadas para identificar o HPV em espécimes, e que permitem quantificar e identificar os vírus responsáveis pelo desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas, incluem a análise do DNA ou RNA viral. As técnicas podem estar agrupadas em testes amplificados pelo alvo, em testes amplificados pelo sinal e em testes não amplificados. A tabela 4 mostra os diferentes testes utilizados para detecção do DNA do HPV (LÖRINCZ, 1996).

Mesmo com uma variedade de métodos moleculares para identificação do vírus, na prática, são utilizadas basicamente apenas três técnicas biomoleculares: PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), Captura Híbrida (CH) e Hibridização *in situ* (HIS), sendo a técnica “*Southern blot*” o padrão-ouro para identificação desse patógeno (BIRNER *et al.*, 2001).

O “*Southern blot*” é uma técnica de hibridização que submete o DNA celular extraído à digestão por endonuclease de restrição, formando fragmentos de tamanhos diferentes, que são então separados por eletroforese de acordo com a sua velocidade de migração. O padrão de fragmentação resultante da digestão do DNA do HPV, contido na massa de DNA celular, é específico para cada tipo de HPV. Após a hibridização com um DNA ou RNA de HPV clonado marcado, a revelação é feita por auto-radiografia ou uso de contra-corantes. Este teste embora

combine alta especificidade e sensibilidade produzindo resultados qualitativos, é utilizado ocasionalmente em experimentos de pesquisa, mas não para indicações clínicas, por ser extremamente laborioso e requerer amostras frescas (TANG, 2002; WANG, 2013).

TABELA 4 - Métodos de testes para alvos DNA ou RNA HPV.

GRUPOS	TESTES
Amplificação do alvo	Reação em cadeia da polimerase (PCR)
	Reação em cadeia da ligase (LCR)
	Amplificação com base na seqüência do ácido nucléico (NASBA)
	Amplificação do deslocamento da cadeia (SDA)
Amplificação do sinal	Sistema de captura híbrida (HCS)
	DNA ramificado (bdDNA)
	Sistema de captura híbrida (HCS)
Não amplificados	Southern blot (SB)
	Dot blot
	Hibridização com filtro <i>in situ</i>
	Southern blot reverso
	Northern blot (NB)
	Hibridização <i>in situ</i> (HIS)

Adaptado de Lörincz (1996).

Outra técnica que pode demonstrar o DNA ou RNA do HPV diretamente em cortes histológicos é a Hibridização *in situ* (HIS). É uma técnica que pode localizar seqüências de ácido nucleico do HPV no interior de células individuais, enquanto preserva a morfologia tecidual e celular, permitindo a avaliação simultânea das alterações associadas com a lesão. Para detecção do HPV, métodos enzimáticos são preferidos aos métodos fluorescentes pela facilidade de interpretação. As características do sinal (difuso ou pontual) podem revelar o estado físico do DNA do HPV. A forma epissomal leva a uma coloração difusa, enquanto que a integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira gera sinais pontuais. Além disso, a intensidade do sinal pode expressar o número de cópias (SAMAMA, *et al.*, 2002; TANG, 2002; BURD, 2003; WOLSCHICK *et al.*, 2007).

1.2. CÂNCER DO COLO UTERINO

1.2.1. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DO COLO UTERINO

A OMS estimou que até 2030 pode-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, com 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. Observa-se que a incidência da doença é cada vez maior nos países em desenvolvimento quando comparada com os países desenvolvidos. No Brasil, a estimativa para os próximos anos é de aproximadamente 518.510 casos novos, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Para o sexo feminino, é esperado um total de 260.640 novos casos de câncer, dentre estes encontra-se o câncer de colo uterino (INCA, 2012).

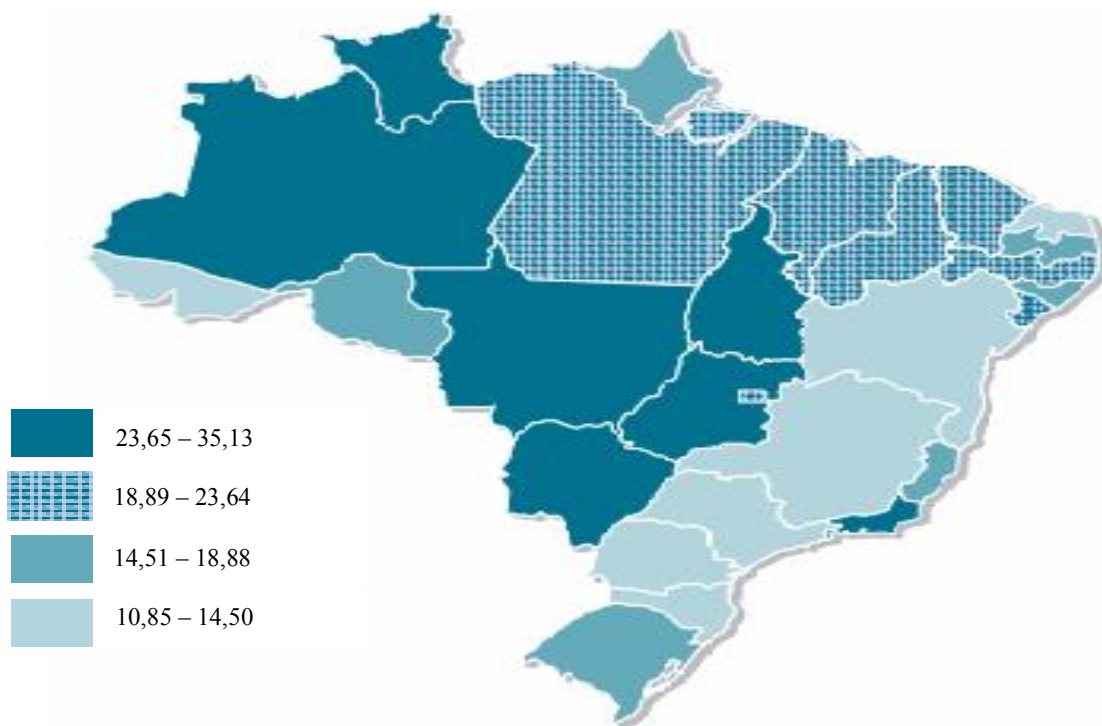
O câncer de colo uterino vem ganhando grandes dimensões, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública. De acordo com Aleixo Neto (1991), desde suas primeiras observações sobre incidência, distribuição e possíveis fatores causais, esse câncer já era considerado um dos mais importantes e danosos cânceres da mulher.

Estimativas mundiais recentes apontam mais de 530 mil casos novos desse câncer em mulheres, configurando-se o câncer de colo uterino como segundo tipo mais comum entre o sexo feminino. Alguns autores apresentam em seus estudos uma incidência mundial variável de câncer de colo uterino, levando em consideração a população estudada e o método diagnóstico empregado. No entanto de acordo com IARC (2013) a incidência mundial está em torno de 15,2%. Essa incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos, com uma razão mortalidade / incidência de 52%, sendo responsável pelo óbito de 275 mil mulheres em 2008. Dentre esses óbitos, 85% ocorrem em países em desenvolvimento (DAS DORES, 2005; INCA, 2012; WHO, 2013).

Os índices nacionais indicam que o câncer de colo uterino poderá contabilizar mais de 18 mil novos casos nos próximos anos, com um risco médio estimado de 17 casos a cada 100 mil mulheres, ficando na sétima posição entre os tipos de câncer mais incidente na população brasileira, sendo também o segundo entre as mulheres (INCA, 2012; IARC, 2013).

Observa-se, de acordo com o apresentado na figura 3, uma maior frequência desses casos encontrados em mulheres residentes nas regiões menos desenvolvidas do país. Assim como a incidência, a distribuição da mortalidade por esse tipo de câncer também se mostra heterogênea nas diferentes regiões do país (GAMARRA *et al.*, 2010).

FIGURA 3 - Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres.




Estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna do colo do útero). Fonte: INCA, 2012.

Considerando a localização primária, o câncer de colo uterino permanece em segundo lugar na região Nordeste, com estimativa de mais de 5 mil novos casos para os próximos anos, totalizando quase 15% dos casos de câncer em mulheres notificados na região, conforme apresentado na tabela 5, e tendo como taxa bruto de incidência 19,54 casos para cada 100 mil mulheres a nível regional (INCA, 2012).

O Ceará, que possui uma população feminina um pouco mais de 50% do total, 4.515.901 mulheres, mantém uma incidência em torno de 21,72 mulheres para cada 100 mil. Anualmente, contabiliza-se uma inclusão de 980 novos casos, ficando na capital, Fortaleza, 270 desses novos casos e uma incidência local de 19,55/100 mil (INCA, 2012).

TABELA 5- Estimativas para o ano de 2012 do número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária - Região Nordeste.

	Localização primária	casos novos	percentual
Mulheres 	Mama Feminina	8.970	26,2%
	Colo do Útero	5.050	14,8%
	Cólon e Reto	1.860	5,4%
	Glândula Tireoide	1.670	4,9%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	1.600	4,7%
	Estômago	1.550	4,5%
	Ovário	1.250	3,7%
	Cavidade Oral	910	2,7%
	Corpo do Útero	900	2,6%
	Leucemias	870	2,5%

Fonte: INCA, 2012.

1.2.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS DO CÂNCER DO COLO UTERINO

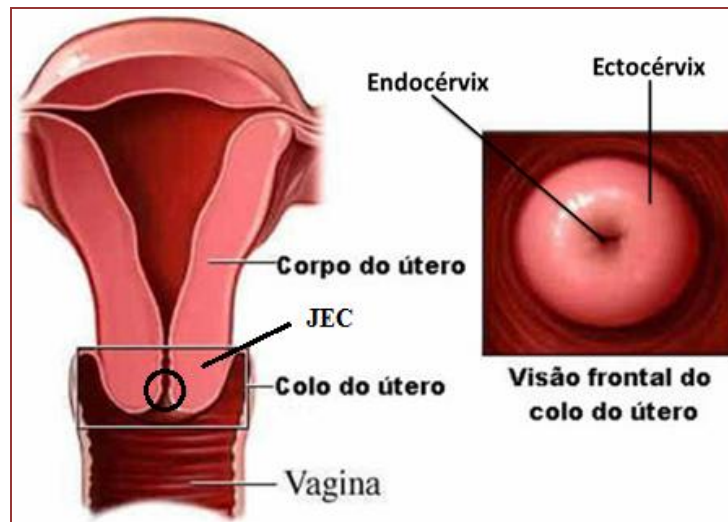
O evento da carcinogênese implica em uma desordem molecular, que pode ser promovida por uma infecção viral persistente. Esse processo, no colo uterino, pode levar ao aparecimento de lesões devido ao crescimento celular desordenado, sendo tais lesões denominadas de lesões precursoras, que poderão persistir e evoluir, ao longo de anos, para uma lesão cancerosa formada por células intraepiteliais escamosas em transformação (CHOW *et al.*, 2010; SASLOW *et al.*, 2012).

A infecção acontece quando o vírus se aloja na superfície traumatizada do epitélio escamoso do colo uterino. A migração do HPV para camada basal do epitélio acontece devido ao seu tropismo por queratinócitos. Atingindo o epitélio pavimentoso, o patógeno perde seu invólucro proteico e o genoma viral invade o núcleo da célula, onde se estabelece a forma episomal. Após a entrada do vírus na célula, que ainda não está funcionalmente comprovada embora se acredita na presença de uma proteína receptora, o genoma viral se estabiliza na forma de elementos extracromossômicos no núcleo e o número de cópias virais aumenta para aproximadamente 50 por célula, que ao se dividirem distribuem equitativamente o DNA viral entre as células filhas. Uma das células filhas migra da camada basal e inicia o programa de diferenciação celular. As demais células filhas continuam se dividindo na camada basal,

servindo de reservatório de DNA viral para as posteriores divisão celular. Para esse processo infeccioso, existem três possíveis evoluções: a) o organismo consegue eliminar o vírus; b) a infecção pode permanecer de forma latente, onde o DNA viral reside no núcleo e a replicação fica ligada ao ciclo celular e c) a infecção pode ser subclínica ou clínica ((PALO *et al.*, 1996; PEREYRA & PARELLADA, 2000; MCMURRAY *et al.*; 2001; SOUTO *et al.*, 2005).

A oncogênese desse tipo de carcinoma se processa essencialmente em nível da zona de transformação da área de encontro das duas mucosas originais (ectocérvice e endocérvice) conhecida como junção escamocolunar (JEC), identificada na figura 4 (ARAÚJO, 2010).

FIGURA 4 - Representação da região anatômica do útero.



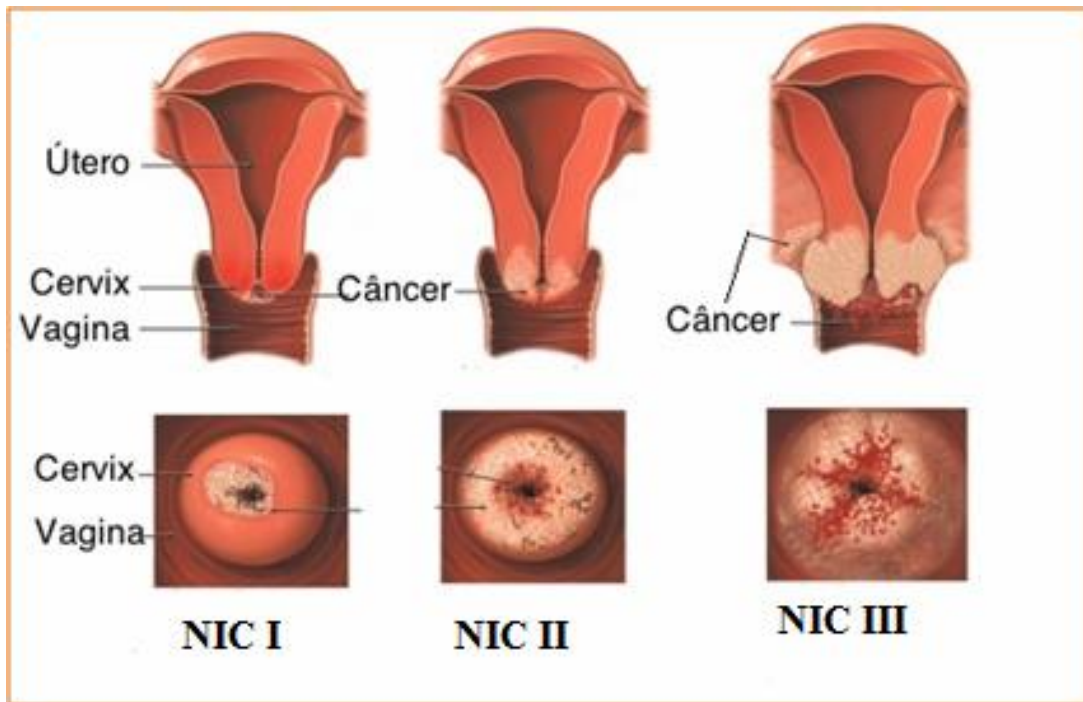
Adaptado de <http://labpath.blogspot.com.br>.
Acessado em outubro de 2012.

É nessa região que se desenvolve uma zona de transformação (ZT), onde ocorre a transformação da mucosa endocervical em mucosa do tipo escamosa. Esse fenômeno acontece a partir da modificação de células normais, que antes eram pequenas, redondas e imaturas, passando a células maduras, que se movimentam para as camadas mais superficiais da região epitelial. Ocorre nessas células uma parada da divisão celular, um aumento do volume do citoplasma, produção de mais queratina e desenvolvimento de picnose nuclear. A célula se torna anucleada, e por fim, se descama normalmente (LAX, 2011).

As infecções por HPV podem ser sintomáticas quando a forma clínica é evidenciável a olho nu, ou assintomáticas, sem manifestação de sinais visíveis. As classificações da forma subclínica são visualizadas sob técnicas de magnificação (lentes) e após aplicação de

reagentes que colorem de forma específica o colo do útero. A existência de teste de triagem que identifique lesões pré-maligas em mulheres (figura 5), as quais poderão está em risco significativo para o desenvolvimento de câncer, pode ser a intervenção apropriada para prevenir a progressão para câncer invasivo (PALO *et al.*, 1996; SASLOW *et al.*, 2012).

FIGURA 5 - Representação da região anatômica transversal do útero e da região frontal da cér-vice vaginal.



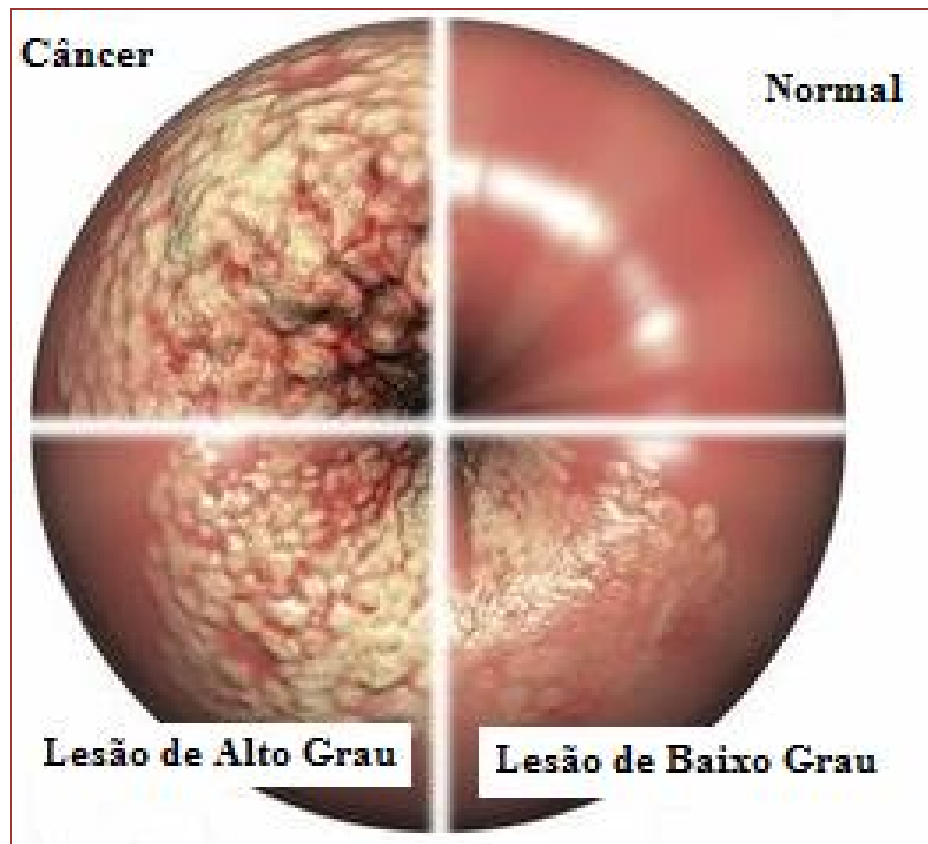
Fonte: <http://www.medicinageriatrica.com.br/2012/01/page/2/> acesso em outubro/2012.

Convencionalmente, a citologia é, inicialmente, o procedimento inicial de escolha, em virtude disso fez necessário estabelecer um padrão nas terminologias para diagnósticos, sendo criado o Sistema Bethesda, durante uma reunião de especialistas realizada na cidade de mesmo nome em Maryland, EUA, no ano de 1988. Nessa reunião foram padronizadas as normas de classificação citológica, com o intuito de reduzir diagnósticos confusos entre alterações celulares benignas e as alterações atípicas, antes propostas por Papanicolaou, Reagan e Richart (VEIGA *et al.*, 2006; HERFS & CRUM, 2013).

O diagnóstico citológico diferenciado para as células escamosas e glandulares, discutido pelo Sistema Bethesda, incorporou vários conceitos e conhecimentos adquiridos. Nesse sentido houve a inclusão do diagnóstico citomorfológico sugestivo da infecção por HPV, devido às evidências do envolvimento desse vírus na carcinogênese dessas lesões. Os

termos citológicos apresentado foram os de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (low grade intraepithelial lesion – LSIL) compreendendo as alterações sugestivas de infecção pelo HPV e neoplasias intraepiteliais de grau I (NIC I), os de lesão intraepitelial escamosa de alto grau (high-grade intraepithelial lesion – HSIL), que englobam as expressões citológicas de NIC II e III (figura 6), e as atipias em células escamosas de significado indeterminado (atypical squamous cells of undetermined significance – ASC-US), que é definida pela presença de achados citológicos insuficientes para o diagnóstico de lesão intraepitelial (APGAR *et al.*, 2003; VEIGA *et al.*, 2006; RUSSOMANO *et al.*, 2008; BRASIL, 2012).

FIGURA 6 - Imagem coloscópica do colo do útero com regiões normal e alterada.

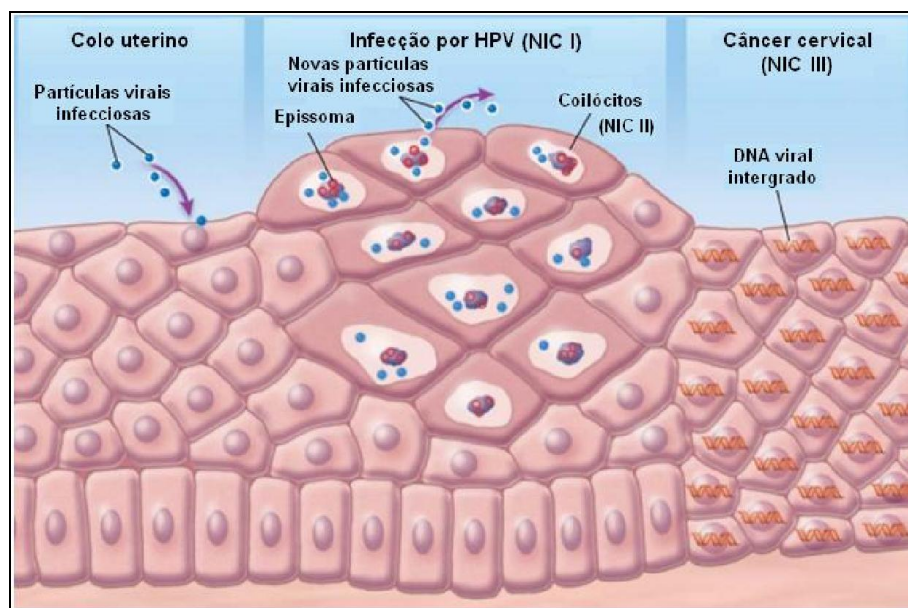


Adaptado de http://cienciasypunto.blogspot.com.br/2011_01_01_archive.html.
Acessado em outubro de 2012.

Estabeleceu-se o conceito de neoplasia intraepitelial e, no caso da cérvix uterina, de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) subdividida em três graus, que se mantém para os

diagnósticos histológicos. Essa nomenclatura baseou-se na constituição do colo uterino, que é revestido por células epiteliais pavimentosas dispostas em camadas organizadas. Esta estratificação é caracterizada pelo desordenamento dessas células (Figura 7). Quando esse desordenamento celular ocorre nas camadas basais do epitélio estratificado, o mesmo é caracterizado como Neoplasia Intraepitelial Cervical grau I (NIC I); quando o desordenamento atinge até os três quartos do epitélio e há preservação das camadas mais superficiais, recebe a denominação de Neoplasia Intraepitelial Cervical grau II (NIC II). Nos casos de Neoplasia Intraepitelial Cervical grau III (NIC III), ocorre uma alteração desordenada em todas as camadas de células, que pode evoluir para uma invasão, em nível de tecido conjuntivo do colo uterino, abaixo do epitélio, sendo então denominado de carcinoma invasor (BRASIL, 2002; APGAR *et al.*, 2003).

FIGURA 7- Processo de Infecção do HPV.



Adaptado de GOODMAN e WILBUR 2003.

Pesquisas recente, reconhecem a necessidade da junção das nomenclaturas NIC II e III, visto que o diagnóstico montado apenas com NIC II pode ser equivocado em algumas situações em que pode incluir algumas lesões pré-cancerosas de maior gravidade e limitar o tratamento, podendo comprometer o prognóstico da doença (SASLOW *et al.*, 2012).

1.2.3. ETIOLOGIA DO CÂNCER DO COLO UTERINO

A investigação etiológica para o câncer do colo uterino, nos últimos 25 anos, priorizou a relação causal entre a infecção pelo HPV e a progressão da doença, devido a isso se pode inferir que restam poucas dúvidas em relação à participação do HPV na etiologia desse tipo de câncer (BRAGAGNOLO *et al.*, 2010).

Embora existam estudos que comprovem a relação direta do vírus com o desenvolvimento da doença, estes foram realizados através de metodologias complexas, visto que esses vírus não se propagam de forma eficiente e rápida em qualquer tipo de células. As primeiras evidências do DNA de HPV foram encontradas em amostras de células cérvico-vaginal, de células mononucleares do sangue periférico e no soro de pacientes com infecção já estabelecida. Posterior a isso, pode-se afirmar ser este vírus o responsável por 99% dos casos de câncer de colo de útero já registrado (ZUR HAUSEN, 2009).

A infecção pelos tipos virais de alto risco do HPV é condição necessária, porém não suficiente para o desenvolvimento do câncer do colo uterino. É comum, essa infecção acometer jovens no início da atividade sexual, mulheres com diferentes hábitos sexuais e parceiros, sendo, portanto um fenômeno transitório em cerca de 80% a 90% dos casos, haja vista que apenas uma pequena fração das portadoras apresenta persistência à infecção, o que associa a existência de fatores diversos, que somados aos efeitos do patógeno, favorecem a progressão da doença (RAMA *et al.*, 2008; SASLOW *et al.*, 2012).

Em estudo feito por Anjo *et al.* (2010) vários fatores que interferem na oncogênese do colo uterino, que podem ser divididos em dois grandes grupos: os documentados experimentalmente e os clínicos ou epidemiológicos. Dentre os classificados no primeiro grupo estão os fatores imunológicos (resposta imune local ou humoral), a associação com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), os fatores genéticos (como polimorfismo da proteína p53), o tabagismo e o uso prolongado de contraceptivos orais.

Entre os fatores de risco clínico ou epidemiológicos se destacam o início precoce da atividade sexual, a multiplicidade de parceiros, a baixa escolaridade e renda, a multiparidade e a história prévia de DST (PINTO *et al.*, 2002).

1.3. MARCADORES MOLECULARES

O processo neoplásico consiste em um evento multicausal que são os responsáveis pelo comprometimento dos controles normais da proliferação celular e da interação célula-célula. Assim essas alterações, em nível moleculares, em diferentes etapas da regulação do ciclo celular são responsáveis pelo estabelecimento do câncer (COOPER & HAUSMAN, 2007; COTRAN *et al.*, 2010).

Nesse contexto, pode-se entender as frequentes pesquisas na identificação de proteínas expressa por essas categorias de genes, as quais são conhecidas como biomarcadores tumorais. A expressão destes marcadores pode refletir diversos processos em andamento nas células tumorais, tais como hiperproliferação, alteração de padrões de expressão gênica, hiperplasia, genotoxicidade, inflamação e alterações enzimáticas relacionadas com o desenvolvimento tumoral, entre outros. Um biomarcador ideal possui relação direta com o processo neoplásico de forma que pode ser usado como ferramenta complementar para o diagnóstico, favorecendo o rastreamento de lesões precursoras (TERMINI & VILLA, 2008).

1.3. 1. PROTEÍNA Ki-67

A proteína Ki-67 foi descoberta em 1991 em Kiel na Alemanha (daí “Ki”), como sendo uma proteína nuclear não-histona. Foi descoberta pouco depois do anticorpo correspondente ter sido descrito pelos mesmos pesquisadores, após a imunização dos ratinhos com células de linfoma de Hodgkin (GERDES, *et al.*, 1983; GERDES *et al.*, 1991).

Os estudos mostram que devido a ausência de Ki-67 em células quiescentes e a sua expressão em núcleo de células em proliferação, vem criando um grande interesse sobre o seu papel como potencial marcador de proliferação celular (URRUTICOECHEA *et al.*, 2005).

O gene *Ki-67*, responsável pela expressão da proteína que leva seu nome, parece estar no braço longo do cromossomo humano 10 (10q25). Em 1993, o grupo de pesquisa liderado pelo pesquisador Schluter publicou a sequência completa do cDNA que a codifica. Nesse mesmo estudo foi identificado ainda que duas espécies de mRNA alternativos, resultantes de *splicing* alternativo, codificam duas isoformas da proteína. A isoforma maior do Ki-67 possui uma massa molecular calculada de 359 kD, e a menor, uma massa de 320 kD (SCHLUTER *et al.*, 1993).

A expressão dessa proteína varia em intensidade ao longo do ciclo celular. Em geral, a evidência indica que os níveis de Ki-67 é acessível nas fases G1 e início da fase S e pode aumentar progressivamente para atingir um máximo durante a mitose (DIERENDONCK, et al., 1991). A meia-vida desse proteína foi estimada em cerca de 60 a 90 minutos e expressões diferentes, ao longo do ciclo celular, não parece ser devido à acumulação de proteínas não degrada, pelo contrário, eles parecem refletir largamente novas sínteses a nível nuclear (URRUTICOECHEA *et al.*, 2005).

1.3.2. PROTEÍNA MYC

A proteína MYC é uma fosfoproteína nuclear codificada pelo oncogene *c-myc*, o qual se caracterizam pela capacidade de promover o crescimento celular na ausência de sinais mitogênicos normais (COTRAN *et al.*, 2010).

O gene *myc* foi primeiramente identificado em um retrovírus associado ao desenvolvimento de mielocitomatose em aves e ficou conhecido como *v-myc* (*viral-myc*). Posteriormente, foi identificado um *myc* homólogo, conhecido como *c-myc*, cuja sua expressão alterada foi identificada em alguns tumores humanos e animais. Dois outros homólogos ao *myc* foram demonstrados em cânceres humanos: o *N-myc*, amplificado em Neuroblastomas; e o *L-myc* em carcinoma pulmonar de pequenas células (do inglês, *Lung*) (GRANDORI *et al.*, 2000; GARDNER *et al.*, 2002; FARIA & RABENHORST, 2006).

O conjunto desses genes é descrito como família de oncogenes *myc*. Está localizado no cromossomo 8q24, sendo constituído de três éxons, podendo ser transcrito a partir de três promotores distintos, codificando três isoformas chamadas de MYC-1 (com 67 kDa), MYC-2 (64 kDa) e MYC-3, também denominada MYC-S (do inglês, *Short*; por ser a menor das três isoformas) (GARDNER *et al.*, 2002; FARIA & RABENHORST, 2006).

A proteína MYC é rapidamente transportada para o núcleo logo após sua tradução, onde atua como fator transcricional. Assim, a MYC necessita combinar-se com outra proteína constitutivamente expressa, denominada Max. Essa dimerização é viabilizada por sequências conservadas presentes na região C-terminal de ambas as proteínas, designadas *helix-loop-helix* (HLH) e *leucine zipper* (LZ). Os heterodímeros MYC/Max se ligam em regiões específicas do DNA que contenham a sequência CACGTG (conhecida como E-box) e ativam a transcrição de promotores adjacentes (AMATI *et al.*, 1998).

A expressão de MYC em células humanas é extremamente controlada, ocorrendo normalmente durante fases específicas do ciclo celular. Todavia, a expressão desregulada desse gene pode acarretar alterações celulares, promovendo uma transformação maligna. Isso foi bem exemplificado em casos de linfoma de Burkitt, onde se observava uma superexpressão do MYC devido a uma translocação entre os cromossomos 8 e 14, que justapõe o locus do *c-myc* sob o controle do promotor da cadeia pesada de imunoglobulina, que é altamente expressa (KLUMB, 2001).

A proliferação desordenada induzida pela superexpressão de MYC, transpondo pontos de checagem do ciclo celular e, subsequentemente, a atividade de mecanismos de reparo do DNA, pode culminar em instabilidade genômica (GARDNER et al., 2002). Esse efeito proliferativo está possivelmente relacionado à indução de ciclinas A, D1, D2, E, além de CDK4, *cdc25A* (uma fosfatase que ativa CDK2 e CDK4) e a inibição da atividade dos supressores tumorais p16^{INK4a}, p21^{CIP1}, p27^{KIP1} e p57^{KIP2} (AMATI et al., 1998; ELEN & EILERS, 1999).

Estudos têm demonstrado que a MYC também está associada ao crescimento celular, metabolismo, inibição de diferenciação, imortalização, angiogênese e apoptose. Pesquisadores tem sugerido que a transposição dos pontos de checagem induzida pela MYC possa atuar como gatilho no processo apoptótico (GRANDORI et al. 2000; GARDNER et al., 2002; PELENGARIS et al., 2002).

A MYC pode ativar indiretamente a p53 através da indução da expressão do p19^{ARF}, que atuaria reprimindo o MDM-2, um modulador negativo da p53, promovendo a transcrição da proteína pró-apoptótica Bax. Tem sido demonstrado também, que pode sensibilizar a célula para estímulos apoptóticos providos por receptors. Essas evidências sugerem que um possível efeito sinérgico entre a expressão de MYC e a inibição da apoptose poderia contribuir no processo tumorigênico (HUEBER et al., 1997; GRANDORI et al, 2000; PELENGARIS et al., 2002).

1.4. PERGUNTA DE PARTIDA

- Existe associação entre o padrão de expressão das proteínas Ki-67 e MYC com a presença do Papilomavírus Humano (HPV) em pacientes com Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC)?

1.5. HIPÓTESE DO TRABALHO

- A superexpressão das proteínas Ki-67 e MYC está relacionada com a presença do vírus.
- O aumento da expressão de MYC nas pacientes com NIC pode estar associado com a proliferação celular (Ki-67).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Correlacionar a expressão das proteínas Ki-67 e MYC em pacientes portadoras de Neoplasia Intraepiteliais Cervical (NIC) e associar com a presença do HPV.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a presença do Papilomavírus Humano (HPV) por Hibridização in situ em pacientes com NIC atendida em ambulatório de patologia cervical da MEAC.
- Determinar a frequência da expressão das proteínas Ki-67 e MYC em pacientes com NIC de acordo com a classificação de Organização Mundial de Saúde (WHO).
- Comparar a frequência da expressão das proteínas Ki-67 e MYC com a presença de HPV, considerando a gravidade das lesões.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. L. P. SOUZA, R. P.; GIMENES, F.; CONSOLARO, M. E. L. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. **Virology Journal**, Paraná, v. 9, n. 262, p.1-9, 2012.

ALEIXO NETO, A. Aspectos epidemiológicos do câncer cervical. **Rev. Saúde pública**. São Paulo, v. 25, n. 4, p. 326-233, 1991.

ALMEIDA, J. D.; ORIEL, J. D.; STANNARD, L. M. Characterization of the virus found in human genital warts. **Microbios**, LOCAL v. 3, p. 225-232, 1969.

AMATI, B.; ALEVIZOPOULOS, K.; VLACH, J. Myc and the cell cycle. **Front. Biosci.**, v. 3, p. 250-268, 1998.

ANJOS, S. J. S. B; VASCONCELOS, C. T. M.; FRANCO, E. S.; ALMEIDA, P. C.; PINHEIRO, A. K. B. Fatores de risco para câncer de colo do útero segundo resultados de IVA, citologia e cervicografia. **Rev. Esc. Enferm.USP**, Fortaleza, v. 44, n.4, p. 912-920, 2010.

APGAR, B. S.; ZOSCHNICK, L.; WRIGHT JR, T. C. The 2001 Bethesda System Terminology. **American Family Physician**. New York, v. 68, n. 10, p. 1992-1998, 2003.

ARAÚJO, S.R. **Citologia Cérvico-vaginal**. 1ª. Edição. LOCAL: Freegraff, 2010. p.119-139.

AYRES, A. R. G.; SILVA, G. A. Prevalência de infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil: revisão sistemática. **Rev. Saúde Pública**. v.44. n.5. p. 963-974. 2010.

BAAK, J.P.A.; KRUSE, A.J.; ROBBY, S.J.; JANSSEN, E. A. M.; VAN DIERMEN, B.; SKALAND, I. Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. **J Clin Pathol** ;59:1017–1028. 2006.

BAGARELLI, L.B.; OLIANI, A. H. Tipagem e Estado Físico de Papilomavírus Humano por Hibridização in situ em Lesões Intra-epiteliais do Colo Uterino. **RBGO**. v. 26, nº 1. 2004

BIRNER, P.; BACHTIARY, B.; DREIER, B.; SCHINDL, M.; JOURA, E. A.; BREITENECKER, G.; OBERHUBER, G. Signal-Amplified Colorimetric In Situ Hybridization for Assessment of Human Papillomavirus Infection in Cervical Lesions. **The United States and Canadian Academy of Pathology**. v. 14, n. 7, p. 702,. 2001

BRAGAGNOLO, A.L.; ELI, D.; HAAS, P. Papiloma Vírus Humano (HPV). **RBAC**, vol. 42 (2): 91-96, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Nomenclatura brasileira para Laudos Citopatológicos Cervicais. 2012a. Disponível

http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/nomenclatura_laudo_cervical.pdf. Acesso em: Outubro. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância (Conprev). Falando sobre câncer do colo do útero. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde /INCA, 2002.

BURK, R.D.; KELLY, P.; FELDMAN, J.; BROMBERG, J.; VERMUND, S.H.; DEHOVITZ, J.A. Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. **Sex Transm Disease**. 23:333-41, 1996.

BURD, E.M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin Microbiol**. 16(1): 1-17, 2003.

CENTO, V.; CICCOCCHI, M.; RONGA, L.; PERNO, C. F.; CIOTTI, M. Genetic diversity of human papillomavirus type 16 E6, E7 and L1 gene in Italian women with different grades of cervical lesions. **Journal of Medical Virology**. 81:1627 -1634. 2009.

COOPER, G.M.; HAUSMAN, R.E. A célula: uma abordagem molecular. 3ª ed. Porto Alegre: **Artmed**. 2007.

CORNET, I.; GHEIT, T.; CLIFFORD, G.M.; COMBES, J.; DALSTEIN, V.; SILVIA FRANCESCHI, S.; TOMMASINO, M.; CLAVEL, C. Human papillomavirus type 16 E6 variants in France and risk of viral persistence. **Infectious Agents and Cancer**. 2013.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, S.L. Robbins-Patologia estrutural e funcional. 8ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. 2010.

CHOW, L.T.; BROKER, T.R.; STEINBERG, B.M. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. **APMIS**, USA, 118, p.422–449, 2010.

DA ROSA, M. I.; MEDEIROS, L.R.; ROSA, D.D.; BOZETI, M.C.; SILVA, F.R.; SILVA, F.R.; SILVA, B.R. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, n. 5, p. 953-964, 2009.

DAS DORES, G.B. Epidemiologia do HPV. In: ROSENBLATT, C.; WROCLAWSKI, E.R.; LUCON, A.M.; PEREYRA, E.A.G. **HPV na Prática Clínica**. São Paulo: Atheneu, 2005.

DELLA TORRE, G.; PILOTTI, S.; PALO, G.; RILKE F. Viral particles in cervical condylomatous lesions. **Tumori**. v. 64, n. 5, p. 549-53. 1978.

DE VILLIERS, E.M.; FAUQUET, C.; BROKER, T.R.; BERNARD, H.U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17– 27. 2004.

DUGGAN, M. A. A review of the natural history of cervical intraepithelial neoplasia. **Gan To Kagaku Ryoho**. N.29 Suppl 1:176-93. 2002.

DIERENDONCK, J.H.V; WIJSMAN, J.H.; KEIJZER, R.; VAN DE VELDE, C. J. H.; CORNELISSET, C.J. Cell-cycle-Related Staining Patterns of Anti-proliferating Cell Nuclear Antigen Monoclonal Antibodies: Comparison with BrdUrd Labeling and Ki-67 Staining. **American Journal of Pathology**, v. 138. n. 5. 1991.

ELEND, M.; EILERS M. Cell growth: Downstream of Myc – to grow or to cycle? **Current Biology**, v. 9, n. 24, p. 936-938, 1999.

FARIA, M.H.G.; RABENHORST, S.H.B. Impacto do oncogene *C-MYC* no câncer. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 52, n. 1, 2006.

FERRARO, C. T. L.; CANEDO, N. H. S.; PAULA DE OLIVEIRA, S.; CARVALHO, M. G. C. C.; DIAS, E. P. Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. **J Bra Patol Med Lab**, Rio de Janeiro, v.47,n.4, p.451-459, agosto, 2011.

GAMARRA, C.J.; VALENTE, J.G.; SILVA, G.A. Magnitude da mortalidade por câncer do colo do útero na Região Nordeste do Brasil e fatores socioeconômicos. **Rev Panam Salud Publica** . vol.28, n.2, pp. 100-106. 2010.

GARCÍA-ESPINOSA, B.; MORO-RODRIGUES, E.; ALVAREZ-FERNÁNDES, E. Genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in histological sections of cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical carcinoma in Madrid, Spain. **BMC câncer**. 12:533. 2012.

GARCÍA-TAMAYO, J.; MOLINA, J.; BLASCO-OLAETXEA, E. El virus del papiloma humano y el câncer cervical. Una revisión de la historia actualizada sobre la investigación del câncer del cuello uterino en Venezuela. **Invest Clin.**, v. 51, n. 2, p. 193-208, 2010.

GARDNER, L.; LEE, L.; DANG, C. myc oncogene. In: BERTINO, J. R. (Org). *Encyclopedia of Cancer* , 2. ed., vol. 2. Orlando: **Academic Press**, 2002.

GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; STEIN, H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int J Cancer**. 15;31(1):13-20. 1983.

GERDES, J.; LI, L.; SCHLUETER, C.; DUCHROW, M.; WOHLLENBERG, C.; GERLACH, C.; STAHRMER, I.; KLOTH, S.; BRANDT, E.; FLAD, H.D. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. **Am J Pathol**.138(4):867-73. 1991.

GRANDORI, C.; COWLEY, S. M.; JAMES, L. P.; EISENMAN, R. N. The Myc/Max/Mad Network and the Transcriptional Control of Cell Behavior. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** v.16, p. 653-699. 2000.

- GUEDES, T.G.; PORDEUS, A.M.J.; DIOGENES, M.A.R. Análise epidemiológica do câncer do colo do útero em serviço de atendimento terciário no Ceará – Brasil. **RBPS**. 18(4):205-210. 2005.
- GHITTONI, R.; ACCARDI, R.; HASAN, U.; GHEIT, T.; SYLLA, B.; TOMMASINO, M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human Papillomaviruses. **Virus Genes**. v. 40, p. 1–13. 2010.
- HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev. Med. Virol**. v. 16, p. 83-97, 2006.
- HOWIE, H.L.; KATZENELLENBOGEN, R. A.; GALLOWAY, D. A. Papillomavirus E6 proteins. **Virology**. n. 384. p.324-334. 2009.
- HOWLEY, P. M.; LOWY, D. R. Papillomaviruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; *et al*. Virology. 4. ed. **Philadelphia: Lippincott William & Wilkins**. 3280p. 2001.
- HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.** , v. 29, p. 577-580, 1981.
- HUEBER, A. O. et al . Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. **Science**, v. 278, p. 1305-1309, 1997.
- HWANG, T. S.; JEONG, J. K.; PARK, M. Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray. **Gynecol Oncol**, 90: 51-56, 2003.
- INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativas 2012 – Incidência de Câncer no Brasil. **MINISTÉRIO DA SAÚDE**. In: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em 15/10/2012.
- KOSHIOL, J.; LINDSAY, L.; PIMENTA, J.M.; POOLE, C.; JENKINS, D.; SMITH, J.S. Persistent Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis. **American Journal of Epidemiology**. v.168. n. 2. 2008.
- KLUMB, C. E. Biologia e Patogênese dos Linfomas Não Hodgkin de Origem B na Infância: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Cancerologia** , v. 47, n. 3, p. 291-301, 2001.
- LANDBERG, G.; ROSS, G. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression in human haematopoietic cells during growth stimulation and differentiation. **Cell Prolif.**, v. 26, p. 427-437. 1993.
- LAX, S. Histopathology of cervical precursor lesion and câncer. *Acta Dermatoven* **APA**. v.20. n.3. 2011.

LETO, M.G.P; SANTOS JUNIOR, G.F; PORRO, A.M.; TOMIMORI, J. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **An. Bras. Dermatol.** vol.86, n.2, pp. 306-317.2011.

LI, C.; WU, M; WANG, J.; ZHANG, S.; ZHU, L.; PAN, J.; ZHANG, W. A population-based study on the risks of cervical lesion an human papillomavirus infection among women in Beijing, people´s Repulic of China. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.** 2012.

LONGWORTH, M. S.; LAIMINS, L. A. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** p.362-372. 2004.

LÖRINCZ, A.T. Molecular methods for the detection of human papillomavirus infection. **Obstet Gynecol Clin North Am.** 23(3):707-30. 1996.

MONTALVO, M.T.; LOBATO, I.; VILLANUEVA, H.; BORQUEZ, C.; NAVARRETE, D.; ABARCA, J.; CALAF, G.M. Prevalence of human papillomavirus in university young women. **Oncology Letters.** 2: 701-706. 2011.

MCMURRAY, H.R.; NGUYEN, D.; WESTBROOK, T. F.; MCANCE, D.J. Biology of human papillomaviruses. *Journal of Experimental Pathology.* 82. 15-33. 2001.

NAKAGAWA, J. T. T.; SCHIRMER, J.; BARBIERI, M. Vírus HPV e câncer de colo de útero. **Rev. Bras. Enferm.** vol.63, n.2, pp. 307-311. 2010.

NATOLI, L.E.E. Archivos Médicos de Actualización en Tracto Genital Inferior - Sistema Bethesda, diez años después. Ano III, Número 6, Abril 2012.

NAM, E. J.; KIM, J. W.; HONG, J. W.; JANG, H.S.; LEE, S. Y.; JANG, . Y.; LEE, D. W.; KIM, S. W.; KIM, J. H.; KIM, Y. T.; KIM, S.; KIM, J. W. Expression of the p16INK4a and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. **Journal of Gynecologic Oncolgy.** v. 19. n 3:162-168, 2008.

OLIVEIRA, L.H.S.; RODRIGUES, E.V.M.; LOPES, A.P.T.A.S.; FERNANDEZ, A.P.; CAVALCANTI, S.M.B. HPV 16 detection in cervical lesions, physical state of viral DNA and changes in p53 gene. **Med J.**121(2):67-71. 2003.

PALO, D.G. Colposcopia e Patologia do Trato Genital Inferior, 2ª. ed. Editora Médica e Científica Ltda, p. 23, 27, 31, 125, 128, 129, 133, 134, 137-139. 1996.

PASSOS, M.R.L.; ALMEIDA, G.; GIRALDO, P.C.; CAVALCANTI, S.M.B.; CORTES JUNIOR, J. C.; BRAVO, R.S.; VARELLA, R. Q.; FIALHO, S.C.A.; VAL, I.C.C. Papilomavírose Humana em Genital, parte I. DST – **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente transmissíveis;** 20(2): 108 – 124. ISSN: 0103-4065. 2008.

PAPANICOLAOU, G.N.; TRAUT, H.F. The diagnostic volve of vargina smears in carcinoma of the utens. **J. Obstet Gynecol,** 1941; 42(2): 193-205.

PELENGARIS, S.; KHAN, M.; EVAN, G. c-Myc: more than just a matter of life and death. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 10, p. 764-776, 2002.

PEREYRA, E.A.G.; PARELLADA, C.I. HPV nas mulheres. In: ROSENBLATT, C.; WROCLAWSKI, E.R.; LUCON, A.M.; PEREYRA, E.A.G. HPV na Prática Clínica. São Paulo: **Atheneu**, p.59-82, 2005.

PEREYRA, E.A.G de; PARELLADA, C.I.; CHUERY, A.C.S. *Papilomavírus humano*. In: Conhecendo o HPV. Patologia do trato-genital inferior Colposcopia e CAF. Collectanea Symposium. São Paulo, Frôntis Editorial, 2000.

PIM, D.; BANKS, L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. **APMIS**.v. 118, p. 471-493. 2010.

PINTO, F.N.; PRUDENTE, F.V.B.; GONÇALVES, M.S.; SILVA, P.D.V.; GIGLIO, A.D. Mutação do gene p53 induzindo predisposição hereditária ao câncer: relato de um caso da síndrome de Li-Fraumeni. **Rev. Med.** v. 81, n. ¼, p. 42-6.2002.

RAMA, C.H.; ROTELI-MARTINS,C.M.; DERCHAIN, S.F.M.; LONGATTO-FILHO, A.; GONTIJO, R.C.; SARIAN, L.O.Z.; SYRJ NEN, K.; ALDRIGHI, J. M. Prevalence of genital HPV infection among women screened for cervical c ncer. **Rev. Saúde Pública**; 42(1):123-30. 2008.

RAPAPORT, D. Biologia do HPV. In: ROSENBLATT, C.; WROCLAWSKI, E.R.; LUCON, A.M.; PEREYRA, E.A.G. HPV na Prática Clínica. São Paulo: **Atheneu**, p.7-23, 2005.

ROSA, M. I.; MEDEIROS, L.R.; ROSA, D.D.; BOZETI, M.C.; SILVA, F.R.; SILVA, F.R.; SILVA, B.R. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, n. 5, p. 953-964. 2009.

SAMAMA, B.; PLAS-ROSER, S.; SCHAEFFER, C.; CHATEAU, D.; FABRE,M.; BOEH, N. HPV DNA detection by in situ hybridization with catalysed signal amplification on thin-layer cervical smears. *J Histochem Cytochem.* 50 (10): 1417-1420. 2002.

SASLOW, D.; SOLOMON, D.; LAWSON, H. W.; KILLACKEY, M.; KULASINGAM, S. L.;CAIN, J.; GARCIA, F. A. R.; MORIARTY, A.T.; WAXMAN, A.G.; WILBUR, D.C.; WENTZENSEN, N.; DOWNS JR, L. S.; SPITZER, M.; MOSCICKI, A.; FRANCO, E. L.; STOLER, M.H.; SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P.E.; MYERS, E. R. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer. **Cancer J Clin.** 62:147-172. 2012.

SICHERO, L.; SOBRINHO, J.S.; VILLA, L.L. Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants. **Virology**.v.432. p.127-132. 2012.

SILVA, A.M.T.C.; AMARAL, M.V.T.; CRUZ, A. D. HPV e Câncer: O papel do papiloma vírus humano na carcinogênese. **Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**. n.29. 2002.

SILVA FILHO, A. M.; LONGATTO FILHO, A. Colo uterino e vagina: processos inflamatórios – aspectos histológicos, citológicos e colposcópicos. **Revinter**. p. 193-200, 2000.

SOUTO, R.; FALHARI, J.P.B.; DIVINO DA CRUZ, A. O papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 51(2), p.155-160, 2005.

SYRJÄNEN, S. M.; SYRJÄNEN, K. J.; HAPPONEN, R. Human papillomavirus (HPV) DNA sequences in oral precancerous lesions and squamous cell carcinoma demonstrated by *in situ* hybridization. **Journal of Pathologia Oral**, v. 17, p. 273-278, 1988.

SYRJÄNEN, S.; SYRJÄNEN, K. The History of Papillomavirus Research. **Cent. Eur. J. Public Health**, v.16, p. 7-14. Suplemento. 2008.

SCHEURER, M.E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ. Human papillomavirus infection:biology, epidemiology and prevntion. **Ins J. Gynecol Cancer**. 2005. 15. 727-746. 2005.

SCHLUTER, C.; DUCHROW, M.; WOHLBERG, C.; BECKER, M. H. KEY, G.; FLAD, H.D.; GEDES, J.: The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 123 : 513 -522, 1993.

TANG, W. K. Oncogenic human papillomavirus infection: epidemiology in local high-risk women. **Hong Kong Dermatol Venereol Bulletin**, 10 (4): 160- 163, 2002.

TERMINI, L.; VILLA, L.L. Biomarkers in cervical cancer screening. **DST – J bras Doencas Sex Transm**. 20(2): 125-131. 2008.

ULEBERG, K.E.; MUNK, A.C.; SKALAND, I.; FURLAN, C. DIERMEN, B.V.; GUDLAUGSSON, E.; JANSSEN, E.A.M.; MALPICA, A.; FENG, W.; HJELLE, A.; BAAK, J.P.A. A protein profile study to discriminate CIN lesions from normal cervical epithelium. **Cell Oncol**. 34:443–450. 2011.

URRUTICOECHEA, A.; SMITH, I. E.; MITCH, D. Proliferation Marker Ki-67 in Early Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**. vol. 23, n. 28. p.7212-7220. 2005.

VEIGA

WANG, J.; YANG, Y.; DONG, W.; SUN, J.; TAO, H.; LI, R.; HU, Y. Application of Human Papillomavirus in Screening for Cervical Cancer and Precancerous Lesions Asian Pacific. **Journal of Cancer Prevention**, Vol 14. 2013

WENTZENSEN, N.; SCHWARTZ, L.; ZUNA, R. Z.; SMITH, K.; MATHEWS, C.; GOLD, M.A.; ALLEN, R. A.; ZHANG, R.; DUNN, S. T.; WALKER, J. L.; SCHIFFMAN, M. Performance of p16/Ki-67 Immunostaining to Detect Cervical Cancer Precursors in a Colposcopy Referral Population. **Clin Cancer Res.** 18(15) . 2013.

WOLSCHICK, N. M.; CONSOLARO, M. E. L.; SUZUKI, L. E.; BOER, C.G. Cervical uterine cancer: emerging technologies on the diagnosis, treatment and disease prevention. **RBAC**, vol. 39(2): 123-129, 2007.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. **Virology**. v. 384. p. 260-265. 2009.

4. ARTIGO

Em elaboração para ser publicado:

Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention FI – 4.12;

Journal of Molecular Biomakers & Diagnosis FI : 2.04

EXPRESSÃO DE Ki-67 E MYC NA PROGRESÃO DAS NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS CERVICAIS ASSOCIADO AO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV), DETECTADO POR HIBRIDIZAÇÃO *in situ*.

Érika Hardy Lemos¹, Tatiana Dantas Rodrigues, Gedeane Pereira Taveira , José Eleutério
Júnior, Silvia Helena Barem Rabenhorst^{1*}.

¹Universidade Federal do Ceará
Departamento de Patologia e Medicina Legal
Rua Cel. Nunes de Melo, 1315
Porangabussu - CEP 60183-630
Fortaleza, Brazil.

*Silvia Helena Barem Rabenhorst

Universidade Federal do Ceará – Faculdade de Medicina

Departamento de Patologia e Medicina Legal

Rua Cel. Nunes de Melo, 1315

Porangabussu CEP 60183-630

Fortaleza/CE, Brazil.

Tel.: +55 (85) 3366.8639

Fax: +55 (85) 3267.3840

e-mail: srabenhorst@ hotmail.com

RESUMO

O câncer de colo uterino é, mundialmente, o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres sendo, por isso, considerado um evidente problema de saúde pública. Os estudos epidemiológico e posteriormente a biologia molecular revelaram ser a infecção pelo Papillomavírus Humano (HPV) o fator indispensável para o desenvolvimento de lesões pré-malignas culminando com o câncer de colo uterino. **Objetivo** – O presente estudo tem como objetivo correlacionar a expressão das proteínas MYC e Ki-67 em pacientes portadoras de Neoplasia Intraepiteliais Cervical (NIC) e associar com a presença do HPV. **Materiais e métodos** – O estudo contou com 173 pacientes atendidas nos ambulatórios de Patologia Cervical da MEAC, por suspeita de lesão cervical. Em todas as pacientes foi realizado exame ginecológico onde as áreas com lesão colposcópica foram biopsiadas e encaminhadas para o laboratório de patologia humana da Universidade Federal do Ceará (UFC) de onde obteve-se os laudos histopatológicos com os diagnósticos dessas lesões. Os tecidos biopsiados foram submetidos à imunohistoquímica das proteínas celulares (Ki-67 e MYC), através do método da estreptoavidina-biotina-peroxidase e à hibridação *in situ* para detecção de HPV pelo método GenPoint®. **Resultado** - As pacientes incluídas no estudo tinha idade de 14 a 54 anos (mediana de 30 anos). A análise histopatológica revelou para o diagnóstico de NIC, que 41%, eram NIC I, 24,9% NIC II e 34,1% NIC III. Em relação a faixa etária, houve correlação positiva quando associada com o grau de NIC ($p = 0,001$), estando a maior frequência de NIC III nas pacientes com idade de 31 a 40 anos. A presença de HPV foi investigada em todas as amostras, sendo detectada em apenas 17,3% dos casos. O marcador de proliferação celular Ki-67 foi positivo em 80,3% das amostras do estudo. A positividade desse marcador foi de 40,3% em paciente com NIC I, 26,6% com NIC II e 33,1% com NIC III. Considerando a presença de HPV, observou-se que 100% dos casos obteve positividade para o marcador KI-67 ($p = 0,000$). A análise da expressão nuclear da proteína MYC identificou positividade em 61,8% dos casos. Entre as pacientes com o diagnóstico para NIC, pode-se observar que foi positivo para o marcador MYC, 42% em paciente com NIC I, 26,2 % com NIC II e 31,8% com NIC III. A presença de HPV foi identificada em 83,3% no caso de MYC positivo, mostrando uma correlação positiva ($p = 0,007$). **Conclusão** - As análises do Ki-67 o índice de proliferação parece ser o diferencial entre os graus da lesão. Adicionalmente a desregulação de MYC parece ser um evento inicial e idenpendete de HPV, entretanto concomitantemente expressão MYC e do Ki-67 está associada com a severidade das lesões na presença de HPV. Esse achados pode ser utilizado como importante instrumento na avaliação das lesões precursoras do câncer do colo uterino, favorendo um bom prognóstico no aparecimento precoce das lesões.

Palavras-chaves – Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC); HPV; MYC; KI-67; Marcadores Moleculares.

INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino é mundialmente o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres sendo, por isso, considerado um evidente problema de saúde pública (INCA, 2012). Os estudos epidemiológicos e posteriormente a biologia molecular revelaram ser a infecção pelo Papillomavírus Humano (HPV) o fator indispensável para o desenvolvimento de lesões pré-malignas culminando com o câncer de colo uterino ^{42,52}.

O evento da carcinogênese no colo uterino implica em uma desordem molecular, promovida pela infecção viral persistente que pode levar ao aparecimento de lesões devido ao crescimento celular desordenado ⁷. Estas podem persistir e evoluir, ao longo de anos, para uma lesão cancerosa formada por células intraepiteliais escamosas em transformação ²⁴. O valor dessa persistência é sua utilização como um marcador clínico da doença, através da detecção do vírus em lesões precursoras e de alterações moleculares proporcionadas pelo vírus que possam ser indicativas de progressão da doença ^{37,40}.

Considerando que a interação das oncoproteínas do HPV com proteínas do ciclo celular conduz a perturbações do mecanismo do ciclo e subsequente alteração na expressão de algumas proteínas ^{11, 15}. Em virtude disso, alguns estudos na procura de marcadores de progressão da lesão, tem como foco a proteína Ki-67, um conhecido marcador de células proliferativas e portanto importante para identificar lesões potencialmente mais agressivas. Outra proteína bastante estudada e considerada chave no controle do ciclo celular, pois se apresenta desregulada em muitos tipos de câncer, é a proteína MYC ²⁰. No câncer de colo uterino e em lesões pré-malignas, a superexpressão dessa proteína, embora muito pouco estudada, é relatada ser frequente em estágios avançados, ^{1, 12, 38}.

Por outro lado, a detecção do HPV somente é possível por as técnicas de biologia molecular ⁴³. Isso se dá pelo fato de que o HPV não produz viremia e sua replicação se dá essencialmente dentro de queratinócitos do hospedeiro, não sendo possível seu cultivo pelos métodos convencionais em laboratório ⁴⁴. Dentre as técnicas de detecção de DNA viral, a Hibridização *in situ* é uma técnica que permite detectar a sequências de ácido nucléico do HPV no interior de células individuais, enquanto preserva a morfologia tecidual e celular, possibilitando a avaliação simultânea das alterações associadas com a lesão ².

Assim, considerando a importância de novos marcadores indicativos de progressão maligna este estudo teve como objetivo verificar a frequência da proteína MYC correlacionando com o marcador de proliferação celular Ki-67 em pacientes portadoras de NeoplasiaS Intraepiteliais Cervicais (NIC) associando com a presença do HPV.

MATERIAS E MÉTODOS

O projeto proposto está inscrito no Conselho Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Escola Assis Chateaubriand (MEAC) em 12/04/2011, ofício CEP/MEAC nº. 0035/11, protocolo nº. 17/11.

A pesquisa contou com a participação de 173 mulheres com idade variando de 14 a 54 anos (mediana de 30 anos). Todas as pacientes possuíam biópsias com diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC I, II ou III).

Hibridação *in situ* (HIS)

A detecção de DNA do HPV foi realizada por hibridação *in situ* (ISH) com cromôgeno, utilizando um largo espectro de sonda biotilada de DNA do HPV (Dako, Glostrup, Dinamarca), o qual detecta os genótipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51 e 52. A detecção das sondas hibridizadas foi executada usando o sistema de amplificação de sinal de tiramida GenPoint™ (Dako, Glostrup, Dinamarca), e os procedimentos foram realizados seguindo as recomendações do fabricante, bem como protocolo previamente estabelecido.

Imuno-histoquímica

Realizou-se o método imuno-histoquímico da estreptoavidina-biotina-peroxidase adaptado de Hsu et al. (1981)²⁶ para a detecção das proteínas celulares KI-67 e MYC, conforme descrito a seguir: Desparafinação e hidratação em gradiente xileno-álcool-água. Recuperação antigênica em câmara de Pascal utilizando tampão citrato 10mM pH=6,0 (120°C/ 15 PSI), por 3,4 minutos. Bloqueio da peroxidase endógena, em peróxido de hidrogênio a 3%, por 10 min. Incubação das lâminas com o anticorpo primário (DakoCytomation®) (diluição KI-67 1:80; MYC 1:80), em geladeira (4 - 8°C) por 16 horas. Detecção pelo sistema LSAB+ (DakoCytomation®), seguindo as recomendações do fabricante. Revelação pelo sistema DAB+ (3,3'-diaminobenzidina) (DakoCytomation®), seguindo as recomendações do fabricante. Contra-coloração com Hematoxilina de Carrasi. Desidratação em gradiente de água-álcool-xileno, por fim montagem.

Análise da Imunohistoquímica

Admitiu-se como marcação, tanto para a imuno-histoquímica com para a HIS, a presença de uma coloração marrom característica, adquirida pelo cromógeno após oxidação, situadas nas regiões nucleares das células da camada epitelial escamosa, em contraste com o azul/violeta conferido pela hematoxilina, constatada por microscopia óptica.

Para a imuno-histoquímica foi estimada através de contagem manual utilizando microscopia óptica o índice de marcação LI (do inglês, *Labelling index*),³¹. Foram selecionados campos aleatórios (magnificação de 400X), com representativa quantidade de células tumorais. Um mínimo de 500 células foram contadas e o índice de marcação foi calculado com base na seguinte fórmula: $LI = (\text{Total de células marcadas}) / (\text{Total de células contadas}) \times 100$

Foi definido como critério de positividade para o KI-67 a existência de um mínimo de 10% de células marcadas na camada escamosa ($LI > 10$) e para MYC a existência de um mínimo de 5% de células marcadas ($LI > 5$). A marcação LI foi ainda expressada em quartis para cada marcador. Para o marcador KI-67 os quartis foi dividido em Q1 = < 10%, Q2 = 10 – 25%, Q3 = 26 – 50%, Q4 = 51 – 75 % e Q5 = > 75%. Já para o MYC os quartis foi dividido em Q0 = < 5%, Q1 = 5 - 10%, Q2 = 11 – 25%, Q3 = 26 – 50%, Q4 = 51 – 75 % e Q5 = > 75%. A intensidade de marcação também foi avaliada, admitiu-se os padrões: fraca, moderada e forte, com base na intensidade observada.

Para a HIS, considerou-se positivo qualquer marcação marrom nuclear em células da camada epitelial escamosa, independente do percentual de células marcadas, considerando um resultado qualitativo.

Para ambas as técnicas foram avaliados ainda, a distribuição da marcação na camada epitelial escamosa, considerando como: (1) marcação focal, a constatação de ilha(s) de células coilocíticas marcadas; ou (2) marcação difusa, a constatação de células coilocíticas marcadas dispersas em toda camada analisada.

Análises Estatística

Os dados clínico-patológicos, assim como os resultados das técnicas de hibridação *in situ* e imuno-histoquímica, foram demonstrados através de gráficos e tabelas com o auxílio do programa Microsoft Excel_ 2000.

A correlação das variáveis observadas foi realizada através do programa estatístico EPINFO_ versão 3.5.1 e SPSS_ 20.0, utilizando-se o Teste do Qui-quadrado (χ^2), Teste Exato de Fisher, Correlação Linear de Spearman. Foram considerados estatisticamente significantes, valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

ANÁLISE CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

Nesse estudo a idade das pacientes variou de 14 a 54 anos, com mediana de 30 anos. O valor da mediana foi utilizado para determinação do ponto de corte para a formação do grupo ≤ 30 anos e > 30 anos. A neoplasia intraepitelial cervical grau I foi identificada em 41% (71/173), NIC II em 24,9% (43/173) e NIC III em 34,1% (59/173) das pacientes. Pacientes na faixa de etária de 21 a 30 anos apresentaram as maiores frequências de NIC I (46,5%; 33/71) e NIC II (46,5%; 20/43), enquanto que pacientes na faixa etária 31 a 40 anos NIC III foi mais frequente 42,4% (25/59). A tabela 1 mostra a distribuição dos graus de NIC considerando o ponto de corte de 30 anos. Por esta tabela observa-se que as pacientes com idade ≤ 30 anos foram estaticamente mais frequentes com NIC I enquanto que as mulheres com idade > 30 anos foram estaticamente associadas com lesões de maior gravidade.

TABELA 1. Distribuição do grau de NIC entre as faixas etárias ≤ 30 anos e > 30 anos.

IDADE	Total	NIC I (N=71)	NIC II (N=43)	<i>p</i>	NIC III (N=59)	<i>p</i>	NIC II / III (N=102)	<i>p</i>
		N (%)	N (%)		N (%)		N (%)	
≤ 30 anos	93	47 (50,5%)	26 (28,0%)	0,536	20 (21,5%)	0,000*	46 (49,5%)	0,006*
> 30 anos	80	24 (30,0%)	17 (21,2%)		39 (48,8%)		56 (70,0%)	
Total		71	43		59		102	

NIC - Neoplasia Intraepitelial Cervical I, II, III e II/III. * Significado estatístico comparando com NIC I.

A positividade para Ki-67 foi observada em 80,3% (139/173) da amostra desse estudo e para a proteína MYC observada em 62,4% (108/173). Para ambos os marcadores, a marcação foi predominantemente do tipo difusa ($r = 0,664$, $p = 0,000$; $r = 0,616$, $p = 0,000$ respectivamente) e com intensidade moderada/forte ($r = 0,578$; $p = 0,000$; $r = 0,424$; $p = 0,000$ respectivamente). Adicionalmente considerando a distribuição (focal, difuso), foi observado uma correlação positiva entre a gravidade da lesão e a presença de marcação difusa para o Ki-67 ($r = 0,170$; $p = 0,025$).

A tabela 2 mostra a distribuição da positividade dos marcadores Ki-67 e MYC de acordo com grau de NIC e a idade das pacientes. Não houve diferença quanto a positividade desses marcadores e a gravidade de neoplasias intraepiteliais cervicais. Contudo, considerando o corte da idade foi observado que a positividade para o Ki-67 foi estatisticamente associada a pacientes com idade > 30 anos com NICII /III, enquanto que a positividade de MYC foi estaticamente associada com pacientes ≤ 30 anos com somente com NIC III.).

TABELA 2. Positividade dos marcadores entre as faixas etárias ≤ 30 anos e > 30 anos de acordo com o grau de NIC.

MARCADOR	IDADE	NIC I (N=71)	NIC II (N=43)	<i>p</i>	NIC III (N=59)	<i>p</i>	NIC II / III (N=102)	<i>p</i>
		N (%)	N (%)		N (%)		N (%)	
Ki-67 +	≤ 30 anos	37 (48,7%)	23 (30,3%)	0,699	16 (21,0%)	0,246	39 (51,3%)	0,026*
	> 30 anos	19 (30,2%)	14 (22,2%)		30 (47,6%)		44 (69,8%)	
TOTAL		56 (78,9%)	37 (86,0%)	0,338	46 (78,0%)	0,900	83 (81,4%)	0,684
MYC +	≤ 30 anos	29 (46,8%)	20 (32,2%)	0,459	13(21,0%)	0,028*	33 (53,2%)	0,307
	> 30 anos	17 (37,0%)	8 (17,4%)		21 (45,6%)		29 (63,0%)	
TOTAL		46 (64,8%)	28 (65,1%)	0,971	34 (57,6%)	0,403	62 (60,8%)	0,592

Pacientes (N=173) distribuídas nas faixas etárias ≤ 30 anos e > 30 anos, de acordo com Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC I, II, III e II/III), usando como referência o grupo NIC I para determinação estatística.

* **Significado estatístico.**

Os índices de marcação (LI) de Ki-67 e MYC foram distribuídos em quartis (Q) e

analisados de acordo com a gravidade da lesão (gráfico I). Por esse gráfico, pode-se observar que os todos os casos NIC tiveram uma frequência relevante de células marcada. Entretanto com relação ao Ki-67 observa-se que no QIII que representa 26 a 50% que NICI foi a lesão mais frequente enquanto que no QIV-V, que representa ≥ 51 , as lesões NICIII são as mais frequentes. De fato, comparando os LI de acordo com as lesões observou-se que o número de células marcadas para Ki-67 em NICIII e NICII/NICIII foram estaticamente maiores que NICI. Essa diferença não foi observada para MYC, entretanto vale ressaltar que a frequência a alta porcentagem de casos dentro dos quartis que representam um relevante número de células marcadas.

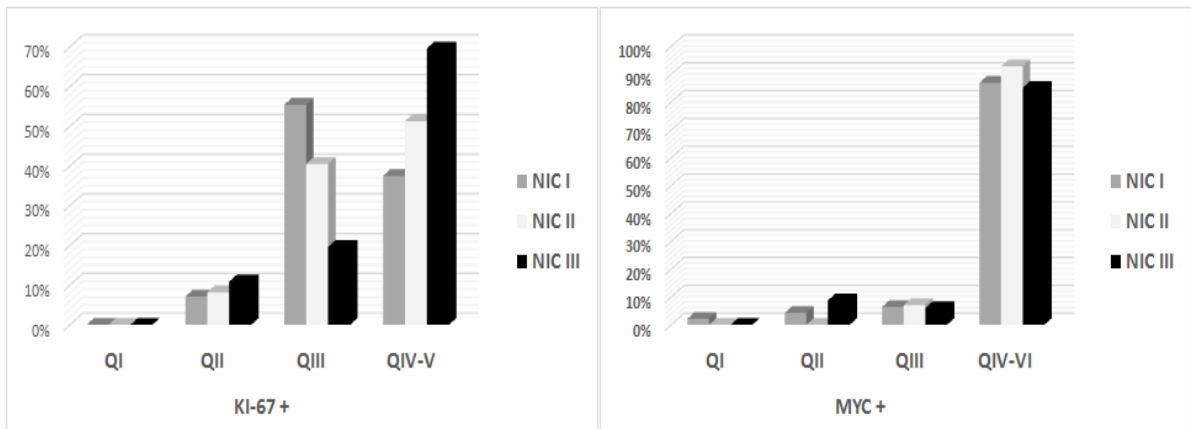


GRÁFICO 1. Distribuição do índice de marcação (LI) em quartis (Q) das proteínas nos três graus de NIC. Quartis (Q) para Ki-67 (QI = < 10%; QII = 10 a 25%; QIII = 26 a 50%; QIV -QV = ≥ 51 e para MYC (QI = < 5%; QII = 5 a 10%; QIII = 11 a 25%; QIV = ≥ 26 %).

A presença de HPV foi detectada em apenas 17,3% (30/173) dos casos. A maioria das pacientes HPV positivo, 53,3% (16/30) estavam na faixa de idade ≤ 30 anos, desta 87,5% (14/16) possuíam de 21 a 30 anos. A maior frequência, 50% (15/30) de HPV positivo, foi estaticamente associado às mulheres com NIC II ($p = 0,0004$) e 80% (24/30) ou considerando NIC II/III ($p = 0,009$). A marcação do DNA viral foi observada na forma difusa, pontual ou mista. A marcação pontual foi a marcação mais frequente na amostra geral (73,3% (22/30)), seguida da mista com 20% (6/30) e da difusa 6,7% (2/30), sendo também a mais frequente dentro de cada grupo de lesão. A maior frequência de marcação pontual foi em pacientes com Os dois casos de marcação puramente difusas eram NIC III, mas com grande número de

células marcadas.

Todos os casos HPV positivo, 100% (30/30) foram também positivos para o marcador Ki-67 ($p = 0,000$), enquanto que a proteína MYC foi identificada em 83,3% (25/30) dos casos. Ambos marcadores, Ki-67 e MYC, foram significativamente mais frequentes, (26,7%, 8/30; 28%, 7/25 respectivamente) nas pacientes com idade ≤ 30 anos e com NIC II. A tabela 3 mostra a distribuição da positividade dos marcadores Ki-67 e MYC de acordo com a gravidade de NIC e a presença de HPV. Marcação positiva para Ki-67 e para MYC foram significativamente mais frequentes nas pacientes com NIC II e NICII/III quando comparadas com NIC I. Adicionalmente. Correlação positiva foi encontrada entre a presença de HPV e o número de células marcadas (LI) para Ki-67 e MYC ($r = 0,227$; $p = 0,003$; $r = 0,198$; $p = 0,009$).

TABELA 3. Distribuição dos diferentes graus de NIC, relacionando com os marcadores e a presença do HPVs.

MARCADOR		NIC I	NIC II	<i>p</i>	NIC III	<i>p</i>	NIC II / III	<i>p</i>
		(N=71)	(N=43)		(N=59)		(N=102)	
		N (%)	N (%)		N (%)		N (%)	
Ki-67 +	HPV +	6 (20,0%)	15 (50,0%)	0,0007*	9 (30,0%)	0,209	24 (80,0%)	0,010*
	HPV -	50 (45,9%)	22 (20,2%)		37(33,9%)		59 (54,1%)	
MYC +	HPV +	6 (24,0%)	11 (44,0%)	0,009*	8 (32,0%)	0,222	19 (76,0%)	0,031*
	HPV -	40 (48,2%)	17 (20,5%)		26 (31,3%)		43 (51,8%)	

NIC - Neoplasia Intraepitelial Cervical I, II, III e II/III.

* **Significado estatístico comparando com NIC I.**

A tabela 4 mostra a distribuição em quartis do índice de marcação (LI) dos marcadores Ki-67 e MYC considerando a presença de HPV. Todos os casos HPV positivo foram estaticamente associados com os quartis mais elevados para ambos os marcadores.

TABELA 4. Frequência do padrão de marcação do Ki-67 e MYC associadas a presença do HPV.

MARCADORES	QUARTIS	HPV +	HPV -	T	p
		N (%)	N (%)		
Ki-67	QI	0 (00,0%)	34 (23,8%)	66	0,0007*
	QIV-QV	20 (66,7%)	53 (37,1%)	95	
MYC	QI	5 (16,7%)	61 (46,6%)	66	0,0026*
	QIV-QVI	25 (83,3%)	70 (53,4%)	95	

Relação entre o padrão de marcação (LI) de Ki-67 e MYC, relacionando o quartis QI com os QIV a QVI com a presença e a ausência do HPV (HPV+ e HPV-). Distribuição em quartis (Q) para Ki-67 (QI = < 10%; QII = 10 a 25%; QIII = 26 a 50%; QIV = 51 a 75%; QV = > 75%) e para MYC (QI = < 5%; QII = 5 a 10%; QIII = 11 a 25%; QIV = 26 a 50%; QV = 51 a 75%; QVI = > 75%). * **Significado estatístico.**

Adicionalmente, a presença de HPV foi positivamente correlacionada com a intensidade da marcação do Ki-67 ($r = 0,230$; $p = 0,002$). De fato, a maioria (93,3%; 28/30) dos casos HPV positivo foram estaticamente associados a marcação moderada/forte, enquanto que para o MYC, a intensidade da marcação mais frequente para os casos HPV positivo foi a fraca, apesar de não estaticamente significativo (Tabela 5).

TABELA 5. Frequência da intensidade de marcação do Ki-67 e MYC associadas a presença do HPV.

MARCADORES	INTENSIDADE	HPV +	HPV -	T	p
		N (%)	N (%)		
Ki-67	Fraca	2 (6,7%)	25 (22,9%)	27	0,046*
	Moderada / Forte	28 (93,3%)	84(77,1%)	112	
MYC	Fraca	17(68,0%)	50 (60,2%)	67	0,483
	Moderada / Forte	8 (32,0%)	33 (39,8%)	41	

Positividade dos marcadores (Ki-67 e MYC) e a intensidade de marcação (Fraca e Moderada/Forte) nas pacientes (N=173) de acordo presença e ausência do HPV (HPV+ e HPV-). * **Significado estatístico.**

A tabela 6 mostra as análises considerando os dois marcadores Ki-67 e MYC associados e presença de HPV e distribuídos de acordo com NIC. Positividade para ambos foi encontrada em 52% (90/173) das amostras, os quais foram significativamente mais frequente nas pacientes NICII e NICII/III comparada com NICI. Observa-se por essa tabela que

nenhum dos casos HPV positivos foram negativos para ambos os marcadores. Somente a presença de MYC foi observada nos casos de neoplasia intraepitelial cervical HPV negativas, enquanto que Ki-67 é observado em ambas situações HPV positiva e negativa.

TABELA 6. Distribuição dos diferentes graus de NIC, relacionando com os marcadores e a presença do HPVs.

MARCADOR		NIC I	NIC II	<i>p</i>	NIC III	<i>p</i>	NIC II / III	<i>p</i>
		(N=71)	(N=43)		(N=59)		(N=102)	
		N (%)	N (%)		N (%)		N (%)	
Ki-67 (-)	HPV +	0(0,0%)	0(0,0%)	Impossível	0(0,0%)	Impossível	0(0,0%)	Impossível
MYC (-)	HPV -	6(37,5%)	2(12,5%)		8(50,0%)		10(62,5%)	
Ki-67 (+)	HPV +	6(24,0%)	11(44,0%)	0,011*	8(32,0%)	0,262	19(76,0%)	0,040*
MYC (+)	HPV -	31(47,7%)	13(20,0%)		21(32,3%)		34(52,3%)	
Ki-67 (-)	HPV +	0(0,0%)	0(0,0%)	Impossível	0(0,0%)	Impossível	0(0,0%)	Impossível
MYC (+)	HPV -	9(50,0%)	4(22,2%)		5(27,8%)		9(50,0%)	
Ki-67 (+)	HPV +	0(0,0%)	4(80,0%)	0,019*	1(20,0%)	0,472	5(100,0%)	0,395
MYC (-)	HPV -	19(43,2%)	9(20,4%)		16(36,4%)		25(56,8%)	

NIC - Neoplasia Intraepitelial Cervical I, II, III e II/III. * **Significado estatístico comparando com NIC I.**

DISCUSSÃO

Um número cada vez mais frequente de mulheres jovens são diagnosticadas com lesões pré-malignas (Neoplasias Intraepiteliais Cervicais - NIC) precursoras do câncer de colo uterino e portanto, com potencial de desenvolverem câncer em idade precoce^{3, 34}. Por essa razão, estudos, que elucidem alterações nestas lesões são de grande valia no entendimento das vias moleculares envolvida no processo neoplásico bem como podem servir de valor prognóstico para o desenvolvimento de lesões mais agressivas.

Considerando que as interações das oncoproteínas do HPV com proteínas do ciclo celular conduzem a perturbações na sua regulação, um dos marcadores mais estudados é o Ki-67, um conhecido marcador de células proliferativas e de lesões potencialmente mais

agressivas^{35, 47, 49} sendo que em lesões cervicais esses estudos são na sua maioria, associado com o supressor tumoral p16^{5, 13, 17, 35, 49, 50}. Há poucos estudos com MYC em neoplasias intraepiteliais cervicais e não há estudos que o associem ao Ki-67 e HPV. Visto MYC, ser encontrado alterado em câncer de colo uterino, é interessante observar esse marcador nas lesões precursoras. Assim, neste estudo, ambos marcadores foram estudados nas lesões de colo uterino considerando também a influência de HPV na sua expressão.

No presente estudo foi levado em consideração a idade das pacientes, visto que respostas imunológicas tendem a diferir com a faixa etária. Assim as pacientes foram divididas considerando o ponto de corte de 30 anos, que correspondeu à mediana da idade. Outros estudos também tiveram mediana nessa faixa etária, incluindo um da região sudeste e um da região nordeste do Brasil^{19, 29, 31, 46}. Como era esperada, devido à progressão lenta da doença, a maior frequência de NIC I e II foi encontrado nas pacientes com idade ≤ 30 anos e de NIC III em mulheres > 30 anos^{28, 37, 40, 48}. Contudo, é interessante notar que na população estudada, uma fração significativa de pacientes jovens, idade ≤ 30 anos, foram identificadas com NIC II / III. Como neste grupo estão incluídas mulheres com 14 a 18 anos, o encontro de lesões mais graves em idades precoce, indica a iniciação sexual em idade precoce na qual a ectopia cervical é mais susceptível à infecção^{37, 40}.

Nesse estudo, a positividade para o Ki-67 foi observada na maioria das amostras, sendo a frequência de marcação superior à maioria dos valores reportados na literatura (25% a 80%)^{16, 35, 47}. Com relação a MYC, a positividade foi também superior ao estudo de Protrka et al.(2011)³⁸ em lesão cervical. Não houve, nesse estudo, diferenças estatísticas da frequência quanto ao número de casos positivos, para ambos os marcadores, de acordo com a gravidade da lesão. WENTZENSEN et al. (2012)⁵⁰, encontrou resultados semelhantes para o Ki-67, no entanto em estudos que o associam Ki-67 com o p16 diferenças estatística foram observadas quanto ao número de casos e a gravidade da lesão^{5, 35}. Para o MYC o achado deste estudo discorda do único estudo com MYC¹ em pré-lesões, no qual MYC foi observado estaticamente mais frequente em estágios histopatológicos mais comprometidos,. Entretanto, quando a idade é considerada, a positividade para o Ki-67 foi estatisticamente associada a pacientes com idade > 30 anos com NICII /III, apesar de presente também nas mulheres mais jovens, indicando o potencial proliferativo associado ao tempo de desenvolvimento da lesão. Esse dado pode ser corroborado pelo encontro de correlação positiva da marcação difusa para o Ki-67 em lesões mais graves. Por outro lado, a positividade de MYC que foi estatisticamente associada com pacientes ≤ 30 anos com NIC I, pode ser indicativa da alteração desse marcador nas lesões iniciais.

Adicionalmente, quando o índice de marcação foi considerado (LI), observou-se que os quartis que representavam maiores índices de marcação para Ki-67 foram associados às lesões de maior agressividade, concordando com outros estudos ^{4, 22, 49}. Esse fato não foi observado para MYC. Contudo, o fato do MYC ser positivo em um número consideravelmente de casos em todos os graus e em um número relevante de células e, considerando que no câncer de colo uterino a superexpressão dessa proteína, embora raramente estudada, é associada com a progressão da doença ^{12, 38}, indica que a sua desregulação no câncer cervical é um fator inicial e mantido durante a progressão da lesão.

Nesse estudo, 17,3% das lesões foram HPV positivas por hibridação *in situ*, frequência esta inferior a de outros estudos usando a mesma técnica ^{8, 45}. Entretanto, frequência similar foi encontrada em alguns estudos, com amostras semelhantes, utilizando a captura híbrida (CH), que atualmente a técnica utilizada na rotina diagnóstica ^{21, 33, 39}. De fato, a literatura relata uma grande variação da presença de HPV nas lesões intraepiteliais cervical indo de 3,5 % a 95,2 %, utilizando a técnicas de CH e de PCR ^{6, 18, 34}. Essa variação parece ser dependente da região geográfica e dos padrões sexuais da população estudada, e pelo lado técnico, é dependente do desenho do estudo, da frequências dos tipos de lesões incluídas no estudo (maior ou menor gravidade), da carga viral e finalmente da sensibilidade do teste empregado para detecção viral ^{9, 14, 18, 29}.

Uma vantagem da técnica de HIS é a sua associação com a morfologia do tecido e a localização topográfica do DNA viral nas células, favorecendo a avaliação da distribuição do HPV nas lesões ^{33, 51}. Há um consenso que a marcação pontual pode revelar o estado físico do DNA do HPV ¹⁰. A forma episomal leva a uma coloração difusa, enquanto que a integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira gera sinais pontuais ⁴¹. Nos poucos estudos que relatam essa análise, a marcação pontual está frequentemente associada a pacientes NIC III ^{8, 23}. No presente estudo em todos os graus, a marcação pontual foi a mais frequente. Os dois casos puramente difusos foram em NICIII, mas com positividade difusa em um número relevante de células. Conforme Triglia et al (2008) ⁴⁵, a integração do DNA do HPV ao DNA do hospedeiro é um passo importante na carcinogênese cervical, que pode potencialmente ser usada como um marcador de progressão para NIC.

A relação do HPV com o ciclo celular pode ser observada neste estudo pelo fato de que todos os casos HPV positivos eram Ki-67 positivos. O fato do Ki-67, bem como MYC estarem associados estatisticamente aos casos NICII e III e os negativos com NIC I, não os habilitam como marcadores independentes da presença de HPV e de progressão da lesão, pois

ambos estão também em frequência relevante nos casos HPV negativos. Entretanto, observa-se que para o Ki-67, o índice de marcação nos casos HPV positivos foram todos maiores que 50% e intensamente marcados, achado semelhante também foi observado na literatura, o que reconhece esse marcador como um adjuvante de diagnóstico para a classificação das amostras de tecido cervical em transformação ^{22, 25}. Por outro lado, MYC também foi associado com índices consideráveis de marcação (maior que 26%) mas os casos mais fortemente marcados foram mais frequentes nos HPV negativos, indicando uma via MYC dependente, nos casos HPV negativos. De acordo com estudo experimental realizado por Narisawa-Saito et al (2012) ³⁶ um determinado nível de limiar de MYC é suficiente para o desenvolvimento do tumor, embora superexpresso, tal expressão excedente desse marcador pode afetar outras características patológicas, tais como metástases.

Relação interessante foi observada quando esses dois marcadores foram associados. O não encontro de casos HPV positivos com ambos marcadores negativos e a associação estatística de casos HPV positivos e ambos marcadores positivos com lesões mais agressivas, indica que positividade concomitante para esses dois marcadores em casos HPV positivos pode ser usado como indicativa de progressão de lesão.

Em conclusão, nas análises do Ki-67 o índice de proliferação parece ser o diferencial entre os graus da lesão. Adicionalmente a desregulação de MYC parece ser um evento inicial e independente de HPV, entretanto concomitantemente expressão MYC e do Ki-67 está associada com a severidade das lesões na presença de HPV. Esse achados pode ser utilizado como importante instrumento na avaliação das lesões precursoras do câncer do colo uterino, favorendo um bom prognóstico no aparecimento precoce das lesões.

REFERÊNCIAS

1. ABBA, M.C.; LAGUENS, R. M.; DULOUT, F.N.; GOLIJOW, C.D. The c-myc activation in cervical carcinomas and HPV 16 infections. **Mutation Research**. 557; 151–158 2004.
2. ABREU, A.L.P. SOUZA, R.P.; GIMENES, F.; CONSOLARO, M. E. L. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virology Journal*. 9:262. 2012.
3. ALFONSI, G. A.; DATTA, S. D.; MICKIEWICZ, T.; KOUTSKY, L. A.; GHANEM, K.; HAGENSEE, M.; KERNDT, P.; HSU, K.; WEINSTOCK, H.; SHLAY, J. C. Prevalence of High-Risk HPV Types and Abnormal Cervical Cytology in American Indian/Alaska Native Women, 2003–2005. **Public Health Reports**. v. 126. 2011.
4. AMARO-FILHO, S. M.; , GOLUB, J. E.; NUOVO, G. J.; CUNHA, C. B.; LEVI, J.E.; VILLA, L. L.; ANDRADE, C.V.; RUSSOMANO, F. B.; TRISTA, A.; PIRES, A.; NICOL, A. P. A Comparative Analysis of Clinical and Molecular Factors with the Stage of Cervical Cancer in a Brazilian Cohort. **Plos one**. v.8. 2013.
5. ASLANI, F. S.; SAFAEI, A.; POURJABALI, M.; MOMTAHAN, M. Evaluation of Ki67, p16 and CK17 Markers in Differentiating Cervical Intraepithelial Neoplasia and Benign Lesions. **IJMS**.v. 38. n.1. 2013.
6. AYRES, A. R. G.; SILVA, G. A. Prevalência de infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil: revisão sistemática. **Rev. Saúde Pública** [online]. v.44. n.5. p. 963-974. ISSN 0034-8910. 2010.
7. BAAK, J.P.A.; KRUSE, A.J.; ROBBOY, S.J.; JANSSEN, E. A. M.; VAN DIERMEN, B.; SKALAND, I. Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. **J Clin Pathol** ;59:1017–1028. 2006.
8. BAGARELLI, L.B.; OLIANI, A. H. Tipagem e Estado Físico de Papilomavírus Humano por Hibridização in situ em Lesões Intra-epiteliais do Colo Uterino. **RBGO**. v. 26, nº 1. 2004.
9. BIESAGA, B.; SZOSTEK, S.; KLIMEK, M.; JAKUBOWICZ, J.; WYSOCKA, J. Comparison of the sensitivity and specificity of real-time PCR and in situ hybridization in HPV16 and 18 detection in archival cervical cancer specimens. **Folia Histochem Cytobiol**. V. 50, No. 2. pp. 239–247. 2012.
10. BIRNER, P.; BACHTIARY, B.; DREIER, B.; SCHINDL, M.; JOURA, E. A.; BREITENECKER, G.; OBERHUBER, G. Signal-Amplified Colorimetric In Situ Hybridization for Assessment of Human Papillomavirus Infection in Cervical Lesions. **The United States and Canadian Academy of Pathology**. v. 14, n. 7, p. 702. 2001.
11. BRAGAGNOLO, A.L.; ELI, D.; HAAS, P. Papiloma Vírus Humano (HPV). **RBAC**, vol. 42 (2): 91-96, 2010.

12. BRENNAN, S.M.F.; ZEFERINO, L.C.; PINTO, G.A.; SOUZA, R.A.; ANDRADE, L.A.L.; VASSALO, J.; MARTINEZ, E. Z.; SYRJÄNEN K.J. c-Myc protein expression is not an independent prognostic predictor in cervical squamous cell carcinoma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 35: 425-430. 2002.
13. CALIL, L.N.; IGANSI, C.N.; MEURER, L.; EDELWEISS, M.I.A.; BOZZETTI, M.C. Chlamydia trachomatis and human papillomavirus coinfection: association with p16INK4a and Ki67 expression in biopsies of patients with pre-neoplastic and neoplastic lesions. **Braz J Infect Dis**. 15(2):126-31. 2011.
14. CENTO, V.; CICCOCCHI, M.; RONGA, L.; PERNO, C. F.; CIOTTI, M. Genetic diversity of human papillomavirus type 16 E6, E7 and L1 gene in Italian women with different grades of cervical lesions. *Journal of Medical Virology*. 81:1627 -1634. 2009.
15. CHOW, L.T.; BROKER, T.R.; STEINBERG, B.M. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. **APMIS**, USA, 118, p.422–449, 2010.
16. DE CASTRO JUNIOR, M.A.M.; KRUEL, C.D.P.; MEURER, L.; DE CASTRO, A. P. Immunohistochemical expression of P53 and Ki-67 in diethylnitrosamine- induced carcinomas esophageal: experimental model. **Rev. Col. Bra. Cir**. 37(2): 128-134. 2010.
17. DONA, M.G.; VOCATURO, A.; GIULIANI, M.; ROCHETTI, L.; ROLLO, F.; PESCARMONA, E.; CAROSI, M.; VOCATURO, G.; BENEVOLO, M. p16/Ki-67 dual staining in cervix-vaginal cytology: Correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. **Gynecologic Oncology**. 126:198-202. 2012.
18. DOS SANTOS, Jéfferson Castro; CEZAR, Marinês Rodrigues dos Santos; LISBOA, Maillene Rodrigues and MOURA, Maria Manuela da Fonseca. Ocorrência de papilomavírus humano na cérvix uterina de mulheres da região ocidental da Amazônia Brasileira. **Acta Amaz**. vol.43, n.2, pp. 185-190. 2013.
19. ELEUTÉRIO JR, J.; GIRALDO, P. C.; CAVALCANTE, D. I. M.; GONÇALVES, A. K.; ELEUTÉRIO, R. M. N. Associação entre a carga viral de HPV de alto risco, expressão P16^{INKA} e lesões intra-epiteliais do colo do útero. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 53(6): 530-5. 2007.
20. FARIA, M.H.G.; KHAYAT, A. S.; BURBANO, R. R.; RABENHORST, S.H.B. c-MYC amplification and expression in astrocytic tumors. **Acta Neuropathologica**. 116:87-95. 2008.
21. FONTAINE, V.; MASCAUX, C.; WEYN, C.; BERNIS, A.; CELIO, N.; LEFÈVRE, P.; KAUFMAN, L.; GARBAR, C. Evaluation of Combined General Primer-Mediated PCR Sequencing and Type-Specific PCR Strategies for Determination of Human Papillomavirus Genotypes in Cervical Cell Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 928–934. 2007.

22. GALGANO, M.T.; CASTLE, P.E.; ATKINS, K.A.; BRIX, W.K.; NASSAU, S.R.; STOLER, M.H. Using Biomarkers as Objective Standards in the Diagnosis of Cervical Biopsies. **Am J Surg Pathol.** 34(8): 1077–1087. 2010.
23. GUO, M.; GONG, Y.; DEEVERS, M.; SILVA, E. G.; JAN, Y.J.; COGDELL, D. E.; LUTHRA, R.; LIN, E.; LAI, H. C.; ZHANG, W.; SNEIGE, N. Evaluation of a Commercialized In Situ Hybridization Assay for Detecting Human Papillomavirus DNA in Tissue Specimens from Patients with Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Carcinoma. **Journal of Clinical Microbiology.** p. 274–280. 2008.
24. GUPTA, R.; SRINIVASAN, R.; NIJHAWAN, R.; SURI, V. Tissue transglutaminase 2 as a biomarker of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and its relationship to p16^{INK4A} and nuclear factor kB expression. *Virchows Arch.* 456:45-51. 2010.
25. HWANG, T. S.; JEONG, J. K.; PARK, M. Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray. **Gynecol Oncol.** 90: 51-56, 2003.
26. HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.** , v. 29, p. 577-580, 1981.
27. INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativas 2012 – Incidência de Câncer no Brasil. **MINISTÉRIO DA SAÚDE.** In: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em 15/10/2012.
28. JARIENĖ, J.; VAITKIENĖ, D.; BARTUSEVIČIUS, A.; TVARIJONAVIČIENĖ, E.; MINKAUSKIENĖ, M.; NADIŠAUSKIENĖ, R.; KRUMINIS, V.; KLIUČINSKAS, M. Prevalence of Human Papillomavirus Types 16, 18, and 45 in women with Cervical Intraepithelial Changes: associations with Colposcopic and Histological Findings. **Medicina (Kaunas).** 48(1):22-30. 2012.
29. KELEIDIS, T.; AISH, L.; STELLER, M.A.; AISH I.S.; SHEN, J.; FOUKAS, P.; PANAYIOTIDES, J.; PETRIKKOS, G.; KARAKITSOS, P.; TSIODRAS, S. Human Papillomavirus (HPV) detection using In Situ Hybridization in Histologic Samples. *Am J Clin Pathol*, 2011.
30. KOSHIOL, J.; LINDSAY, L.; PIMENTA, J.M.; POOLE, C.; JENKINS, D.; SMITH, J.S. Persistent Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis. **American Journal of Epidemiology.** v.168. n. 2. 2008.
31. LANDBERG, G.; ROSS, G. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression in human haematopoietic cells during growth stimulation and differentiation. **Cell Prolif.**, v. 26, p. 427-437. 1993.
32. LESSA, P. R. A.; RIBEIRO, S. G.; LIMA, D. J. M.; NICOLAU, A. I. O.; DAMASCENO, A. K. C.; PINHEIRO, A. K. B. Presença de lesões intraepiteliais de alto grau entre mulheres

privadas de liberdade: estudo documental. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**. 20(2). 2012.

33. LETO, M.G.P.; SANTOS JUNIOR, G.F.; PORRO, A.M.; TOMIMORI, J. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **An. Bras. Dermatol.** vol.86, n.2, pp. 306-317.2011.
34. MONTALVO, M.T.; LOBATO, I.; VILLANUEVA, H.; BORQUEZ, C.; NAVARRETE, D.; ABARCA, J.; CALAF, G.M. Prevalence of human papillomavirus in university young women. **Oncology Letters**. 2: 701-706. 2011.
35. NAM, E. J.; KIM, J. W.; HONG, J. W.; JANG, H.S.; LEE, S. Y.; JANG, Y.; LEE, D. W. KIM, S. W.; KIM, J. H.; KIM, Y. T.; KIM, S.; KIM, J. W. Expression of the p16INK4a and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. **Journal of Gynecologic Oncolgy**. v. 19. n 3:162-168, 2008.
36. NARISAWA-SAITO, M.; INAGAWA, Y.; YOSHIMATSU, Y.; HAGA, K.; TANAKA, K.; EGAWA, N.; OHNO, S.; ICHIKAWA, H.; YUGAWA, T.; FUJITA, M.; KIYONO, T. A critical role of MYC for transformation of human cells by HPV16 E6E7 and oncogenic HRAS. **Carcinogenesis**. v.33 n.4 pp.910–917. 2012.
37. PIANA, A.; SOTGIU, G.; COCUZZA, C.; MUSUMECI, R.; MARRAS, V.; PISCHEDDA, S.; DEIDDA, S.; MURESU, E.; CASTIGLIA, P. High HPV-51 Prevalence in invasive Cervical Cancers: results of a pre-Immunization survey in North Sardinia, Italy. *Plos One*. v.8. 2013.
38. PROTRKA, Z.; ARSENIJEVIC, S.; DIMITRIJEVIC, A.; MITROVIC,S.; STANKOVIC,V.; MILOSAVLJEVIC, M.; KASTRATOVIC, T.; DJURIC1PROTRKA, J.Co-overexpression of bcl-2 and c-myc in uterine cervix carcinomas and premalignant lesionsEuropean Journal of Histochemistry 2011.
39. RAMA, C.H.; ROTELI-MARTINS, C.M.; DERCHAIN, S.F.M.; LONGATTO-FILHO, A.; GONTIJO, R.C.; SARIAN, L.O.Z.; SYRJÄNEN, K.; ALDRIGHI, J. M. Prevalence of genital HPV infection among women screened for cervical câncer. **Rev. Saúde Pública**; 42(1):123-30. 2008.
40. ROCHA, V. R.; SCHUFFNER, R. O. A.; SOARES, I. I. G.; TIBURCIO, J. D.; RIBEIRO, R. I. M. A.; LOPES, D. L. DOS SANTOS, L. L. Cervical Uterine Lesions: An Epidemiological and Molecular Investigation in Midwestern Minas Gerais, Brazil. **Journal of Medical Virology**. 85:860–865. 2013.
41. SAMAMA, B.; PLAS–ROSER, S.; SCHAEFFER, C.; CHATEAU, D.; FABRE,M.; BOEH, N. HPV DNA detection by in situ hybridization with catalysed signal amplification on thin-layer cervical smears. **J Histochem Cytochem**. 50 (10): 1417-1420. 2002.
42. SICHERO, L.; SOBRINHO, J.S.; VILLA, L.L. Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants. *Virology*.v.432. p.127-132. 2012.

43. SILVA FILHO, A. M.; LONGATTO FILHO, A. Colo uterino e vagina: processos inflamatórios – aspectos histológicos, citológicos e colposcópicos. **Revinter**. p. 193-200, 2000.
44. TERMINI, L.; VILLA, L.L. Biomarkers in cervical cancer screening. **DST – J bras Doencas Sex Transm**. 20(2): 125-131. 2008.
45. TRIGLIA, R.M.; METZE, K.; ZEFERINO, L. C.; ANDRADE, L. A. L.A. HPV in situ hybridization signal patterns as a marker for cervical intraepithelial neoplasia progression. **Gynecologic Oncology**. v. 112. p.114 –118. 2009.
46. ULEBERG, K.E.; MUNK, A.C.; SKALAND, I.; FURLAN, C. DIERMEN, B.V.; GUDLAUGSSON, E.; JANSSEN, E.A.M.; MALPICA, A.; FENG, W.; HJELLE, A.; BAAK, J.P.A. A protein profile study to discriminate CIN lesions from normal cervical epithelium. **Cell Oncol**. 34:443–450. 2011.
47. VASILESCU, F.; CEAUSU, M.; TĂNASE, C.; STĂNCULESCU, R.; VLĂDESCU, T.; CEAUȘU, Z. P53, p63 and Ki-67 assessment in HPV-induced cervical neoplasia Romanian. **Journal of Morphology and Embryology**. 50(3):357–361. 2009.
48. WANG, J.; YANG, Y.; DONG, W.; SUN, J.; TAO, H.; LI, R.; HU, Y. Application of Human Papillomavirus in Screening for Cervical Cancer and Precancerous Lesions Asian Pacific. **Journal of Cancer Prevention**, Vol 14. 2013.
49. WALTS, A. E.; BOSE, S. P16/Ki-67 Immunostaining is useful in stratification of atypical metaplastic epithelium of the cervix. **Clinical Medicine: Pathology**. v.1. p. 35–42. 2008.
50. WENTZENSEN, N.; SCHWARTZ, L.; ZUNA, R. Z.; SMITH, K.; MATHEWS, C.; GOLD, M.A.; ALLEN, R. A.; ZHANG, R.; DUNN, S. T.; WALKER, J. L.; SCHIFFMAN, M. Performance of p16/Ki-67 Immunostaining to Detect Cervical Cancer Precursors in a Colposcopy Referral Population. **Clin Cancer Res**. 18(15). 2013.
51. WOLSCHICK, N. M.; CONSOLARO, M. E. L.; SUZUKI, L. E.; BOER, C.G. Cervical uterine cancer: emerging technologies on the diagnosis, treatment and disease prevention. **RBAC**, vol. 39(2): 123-129, 2007.
52. XUE, Y.; BELLANGER, S.; ZHANG, W.; LIM, D.; LOW, J.; LUNNY, D.; THIERRY, F. HPV16 E2 is an immediate early marker of viral infection, preceding E7 expression in precursor structures of cervical carcinoma. **Cancer Research**. 70(13). 2010.

5. ANEXOS

ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
MATERNIDADE-ESCOLA ASSIS CHATEAUBRIAND
Rua Coronel Nunes de Melo, S/Nº - Rodolfo Tófilo - C.G.C. 07.206.048/0001-08
PABX: (085) 4009-8523 - Fax: (085) 4009-8515
CEP 60430-270 - Fortaleza - Ceará - Brasil

OFÍCIO CEP/MEAC Nº 0035/11

Fortaleza, 12 de abril de 2011.

Protocolo nº 17/11

Pesquisadora responsável: Sílvia Helena Barem Rabenhorst

Deptº/Serviço: Patologia e Medicina Legal/UFC

Título do Projeto: Frequência da Infecção pelo Hpv em Pacientes com Lesões Cervicais do Ceará: Associação com Alterações Citológicas, Histopatológicas e Marcadores Moleculares

Levamos ao conhecimento de V. S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade-Escola Assis Chateaubriand da Universidade Federal do Ceará – CEP/MEAC/UFC, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional da Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196/96 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o projeto supracitado, na reunião de 29 de março de 2011.

A Pesquisadora deverá comparecer ao setor competente da Instituição, onde será realizada a pesquisa, para a confecção dos crachás, munida deste documento.

Igualmente, informamos que a mesma deverá se comprometer a comunicar qualquer ocorrência no desenvolvimento do trabalho, assim como, enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,


Tereza Cristina Alves Ferreira

Coordenador do CEP-MEAC/UFC

6. APÊNDICE

APÊNDICE 1 - MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes

O projeto proposto está inscrito no Conselho Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Escola Assis Chateaubriand (MEAC) em 12/04/2011, ofício CEP/MEAC nº. 0035/11, protocolo nº. 17/11.

O estudo foi do tipo observacional transversal descrito, não controlado, retrospectivo, o qual analisou pacientes com idade acima de 14 anos, com vida sexual ativa, que foram encaminhadas aos ambulatórios de Patologia Cervical da Maternidade Escola Assis Chateaubriand - MEAC. Foram excluídos do estudo, pacientes menores de 14 anos, as virgens e as portadoras, que estejam em tratamento para condilomas externos ou internos, as com tratamento de doença cervical por ablação (crioterapia ou ablação por laser) e as com qualquer condição confirmada ou suspeita de imunossupressão ou imunodeficiência. Foram incluídas apenas as pacientes que aceitaram a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido e concordaram em responder a um questionário sobre características sócio-clínico epidemiológicas o qual continha informações sobre a vida sexual e reprodutiva.

A pesquisa contou com a participação de 173 mulheres com idade variando de 14 a 54 anos e mediana de 30 anos. Todas as pacientes possuíam biópsias com diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC I, II ou III). Entre essas, 54 pacientes foram biopsiadas e essas amostras encaminhadas para o laboratório de patologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) para exame histopatológico, com posterior anamnese. As 119 amostras restantes foram obtidas em arquivos de 2010 a 2013 do departamento de patologia da UFC, com posterior pesquisa de dados sócio-epidemiológico em prontuários.

Após levantamento das amostras foram realizados cortes histológicos de tecidos emblocados, em micrótomo criostato, com uma espessura de aproximadamente 4 e 5 µm, distendido em lâminas silanizadas para posterior análise de HIS e Imunohistoquímica.

Hibridação *in situ* (HIS)

A detecção de DNA do HPV foi realizada por hibridação *in situ* (ISH) com cromôgeno, utilizando um largo espectro de sonda biotilada de DNA do HPV (Dako, Glostrup, Dinamarca), o qual detecta os genótipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51 e 52. A detecção das sondas hibridizadas foi executada usando o sistema de amplificação de sinal de tiramida GenPoint™ (Dako, Glostrup, Dinamarca), e os procedimentos foram realizados seguindo as recomendações do fabricante, bem como protocolo previamente estabelecido.

Imuno-histoquímica

Realizou-se o método imunohistoquímico da estreptoavidina-biotina-peroxidase adaptado de Hsu et al. (1981) para a detecção das proteínas celulares Ki-67 e MYC, conforme descrito a seguir:

1. Cortes histológicos de 5 µm foram fixados em lâminas de vidro devidamente limpas e tratadas com silano a 4%;
2. Passagem das lâminas em estufa pré-aquecida a 65°C, durante 120 minutos;
3. Desparafinação e hidratação em gradiente xileno-álcool-água;
4. Recuperação antigênica em câmara de Pascal utilizando tampão citrato 10mM pH=6,0 (120°C/ 15 PSI), por 3,4 minutos;
5. Bloqueio da peroxidase endógena, em peróxido de hidrogênio a 3%, por 10 min;
6. Incubação das lâminas com o anticorpo primário (DakoCytomation®) (diluição Ki-67 1:80; MYC 1:80), em geladeira (4 - 8°C) por 16 horas;
7. Detecção pelo sistema LSAB+ (DakoCytomation®), seguindo as recomendações do fabricante;
8. Revelação pelo sistema DAB+ (3,3'-diaminobenzidine) (DakoCytomation®), seguindo as recomendações do fabricante;
9. Contra-coloração com Hematoxilina de Carrasi.
10. Desidratação em gradiente de água-álcool-xileno;
11. Montagem com lamínulas e Bálsamo do Canadá.

Em cada bateria de imunohistoquímica, foi incluído um espécime clínico sabidamente positivo para cada proteína, como controle positivo, que foram amostras previamente comprovadas de câncer uterino, para validação do experimento.

Análise da Imunohistoquímica

Admitiu-se como marcação, tanto para a imunohistoquímica com para a HIS, a presença de uma coloração marrom característica, adquirida pelo cromógeno após oxidação, situadas nas regiões nucleares das células da camada epitelial escamosa, em contraste com o azul/violeta conferido pela hematoxilina, constatada por microscopia óptica.

Para a imuno-histoquímica foi estimada através de contagem manual utilizando microscopia óptica o índice de marcação LI (do inglês, *Labelling index*), (LANDBERG & ROSS, 1993). Foram selecionados campos aleatórios (magnificação de 400X), com representativa quantidade de células tumorais. Um mínimo de 500 células foram contadas e o índice de marcação foi calculado com base na seguinte fórmula:

$$LI = (\text{Total de células marcadas}) / (\text{Total de células contadas}) \times 100$$

Foi definido como critério de positividade para o Ki-67 a existência de um mínimo de 10% de células da camada de transformação marcadas ($LI > 10$) e para MYC a existência de um mínimo de 5% de células marcadas ($LI > 5$). A marcação LI foi ainda expressada em quartis para cada marcador. Para o marcador Ki-67 os quartis foi dividido em Q1 = < 10%, Q2 = 10 – 25%, Q3 = 26 – 50%, Q4 = 51 – 75 % e Q5 = > 75%. Já para o MYC os quartis foi dividido em Q1 = < 5%, Q2= 5 - 10%, Q3 = 11 – 25%, Q4 = 26 – 50%, Q5 = 51 – 75 % e Q6 = > 75%. A intensidade de marcação também foi avaliada, admitiu-se os valores: 0 (ausência de marcação), 1+ (fraca), 2+ (moderada), 3+ (forte), com base na intensidade observada.

Para a HIS, considerou-se positivo qualquer marcação marrom nuclear em células da camada epitelial escamosa, independente do percentual de células marcadas, considerando um resultado qualitativo. Foi realizado ainda a identificação da localização do DNA viral : sendo para a forma epissomal, DNA viral não-integrado ao DNA da célula hospedeira, foi denominada difusa e para forma integrada, DNA viral integrado ao DNA da célula hospedeira, foi denominada pontual.

Para ambas as técnicas, HIS e IHQ foram avaliados ainda, a distribuição da marcação na camada epitelial escamosa, considerando como: (1) marcação focal, a constatação de

ilha(s) de células coilocíticas marcadas; ou (2) marcação difusa, a constatação de células coilocíticas marcadas dispersas em toda camada analisada.

Análises Estatística

Os dados clínico-patológicos, assim como os resultados das técnicas de hibridação *in situ* e imuno-histoquímica, foram demonstrados através de gráficos e tabelas com o auxílio do programa Microsoft Excel_ 2000.

A correlação das variáveis observadas foi realizada através do programa estatístico EPINFO_ versão 3.5.1 e SPSS_ 20.0, utilizando-se o Teste do Qui-quadrado (χ^2), Teste Exato de Fisher, Correlação Linear de Spearman. Foram considerados estatisticamente significantes, valores de $p < 0,05$.

APÊNDICE 2 – TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada para participar de uma pesquisa denominada ***FREQUENCIA DA INFECÇÃO PELO HPV EM PACIENTES, COM LESÕES CERVICAIS, DO CEARÁ: ASSOCIAÇÃO COM ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS, HISTOPATOLÓGICAS E MARCADORES MOLECULARES***, que tem como objetivo principal caracterizar o perfil sexual das pacientes atendidas no ambulatório especializado da rede pública e estimar a frequência de infecção do Papiloma vírus Humano (HPV) nessas pacientes.

O propósito deste folheto é esclarecer aberta e claramente todos os procedimentos envolvidos no estudo clínico, antes de sua decisão quanto à participação. O estudo está sendo realizado pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. Cerca de 300 pacientes, mulheres serão incluídas no presente estudo. Portanto, se concordar em participar você será uma delas, que não terá benefício direto imediato, em princípio, mas que estará contribuindo para que se entenda melhor o perfil sexual social e patológico de mulheres cearenses e assim poder beneficiar um número maior de pessoas no futuro.

Nenhuma mudança será feita no seu tratamento, no que diz respeito ao número de aplicações ou nos medicamentos que seriam utilizados. Os efeitos colaterais, porventura existentes serão os do tratamento a que você já iria se submeter e que serão explicados pelo médico assistente. Nenhum efeito colateral poderá ser atribuído ao presente trabalho. A única coisa que será feita de diferente será a coleta de uma amostra de sangue, em torno de 5mL (uma colher de sobremesa), além da coleta de esfregaço endocervical, para se examinar a presença de HPV (e, em caso positivo, a identificação do seu subtipo para análise de risco). Esta coleta será realizada no ambulatório, sob supervisão do seu médico, o que não determinará nenhum risco adicional.

Paralelamente serão anotados alguns dados referentes a você no que diz respeito ao Perfil Social (Estado Civil, idade do nascimento, entre outros), Perfil Sexual (data da última menstruação, uso de contraceptivos, entre outros), História Prévia Clínica (História de câncer na família, entre outros), Quadro Clínico Atual (Queixa Principal) e informações relativas

aos testes de Vulvoscopia e Colposcopia previamente realizados. Estas informações serão perguntadas a você ou poderão ser retiradas do seu prontuário.

É importante entender que você não é obrigada a participar do estudo. Se você decidir não participar ou desejar suspender a participação em qualquer momento, você não precisa dar explicações e continuará sendo assistida e tratada com o melhor cuidado possível, devendo comunicar esta decisão a seu médico, para que ele tome conhecimento e faça os esclarecimentos devidos. Se a qualquer momento seu médico achar melhor realizar uma mudança no tratamento, ele fará a mudança que se fizer necessária sem nenhum prejuízo para a pesquisa.

Fique à vontade para formular pergunta aos pesquisadores, cujos nomes e telefones serão encontrados ao final deste folheto, mesmo que pareça muito simples sua dúvida. Você poderá também conversar sobre o estudo com familiares, amigos ou com o médico que lhe assiste.

Todos os seus dados pessoais serão tratados de maneira estritamente confidencial, ficando sua identificação inteiramente protegida.

A qualquer época você poderá ter acesso às informações e conclusões do presente estudo, bem como os resultados de seus exames individualmente.

Se porventura, surgir alguma informação que possa vir a lhe beneficiar, você será imediatamente comunicada.

Se você tiver alguma dúvida posteriormente, você poderá contatar os pesquisadores descritos abaixo a qualquer momento, bem como se você tiver alguma preocupação com o seu tratamento, a extensão de sua doença ou qualquer outro problema.

Deve ficar bem claro que a qualquer tempo você poderá pedir para sair do estudo se não for mais conveniente para você, devendo comunicar esta decisão a seu médico, para que ele tome conhecimento e faça os esclarecimentos devidos, ficando claro que isso não resultará, em nenhuma hipótese, prejuízo para o seu atendimento atual ou no futuro nesta instituição.

NOME: **Dra. Sílvia Helena Barem Rabenhorst** TELEFONE: (85) 9994-5689

NOME: **Dr. José Eleutério Júnior** TELEFONE: (85) 9986-8350

NOME: **Enfa. Érika Hardy Lemos** TELEFONE: (85) 9993-0446

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA MATERNIDADE ESCOLA ASSIS CHATEAUBRIAN – CEP/MEAC/UFC TELEFONE: (85) 3366-8500

Se você decidir participar então leia e assine o formulário na presença de seu médico e mantenha uma cópia do formulário e desse folheto para sua informação.

Você terá mais tempo para pensar se ainda estiver insegura quanto à participação.

Obrigado por ter lido esse folheto e por considerar sua participação no presente estudo.

TÍTULO DO ESTUDO: *Frequência da infecção pelo HPV em pacientes, com lesões cervicais, do ceará: associação com alterações citológicas, histopatológicas e marcadores moleculares.*

Nome do médico: _____

1. Confirmando que li e entendi o folheto informativo sobre o estudo acima e tive a oportunidade de questionar e tirar as dúvidas que me surgiram.
2. Entendo que minha participação é voluntária e que tenho a liberdade de desistir a qualquer tempo sem apresentar razões e sem que minha assistência médica ou direitos legais sejam afetados.
3. Entendo que os itens de quaisquer dos meus registros médicos podem ser examinados pelos representantes responsáveis pela pesquisa ou pelas autoridades regulatórias, quanto à relevância de minha participação nesse estudo de pesquisa. Concedo permissão para que esses indivíduos tenham acesso aos meus registros.
4. Concordo em participar do estudo acima.
5. É de meu conhecimento que receberei uma cópia do presente formulário de consentimento

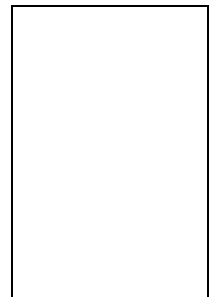
_____, ____/____/____.

Nome completo do Paciente: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Assinatura do Paciente/Representante Legal:



Nome do investigador: _____

Assinatura do investigador: _____

APÊNDICE 3 – DECLARAÇÃO PARA AUTORIZAÇÃO PARA RETIRADA DE BLOCOS



Universidade Federal do Ceará – UFC
Faculdade de Medicina - Departamento de Patologia e Medicina Legal
Rua Monsenhor Furtado, s/n - Rodolfo Teófilo
CEP 60441-750 - Fortaleza - CE
Fone/Fax: (85) 3366-8300
Fax: (85) 3366- 8301

DECLARAÇÃO

Eu, _____, declaro que os representantes responsáveis pela pesquisa intitulada: *FREQUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO HPV EM PACIENTES COM LESÕES CERVICAIS DO CEARÁ: ASSOCIAÇÃO COM ALTERAÇÃO CITOLÓGICA, HISTOPATOLÓGICA E MARCADORES MOLECULARES*, tem a minha autorização para a retirada do bloco contendo material coletado da lesão, que se encontra guardado no laboratório onde a histopatologia foi realizada. Esse material será utilizado se verificado a existência ou não de alteração (exame imunohistoquímico) no material com lesão.

Fortaleza, ____/____/____

Participante

APÊNDICE 4 –TABELAS COMPLEMENTARES

TABELA 1. Distribuição da amostra de acordo com as faixas etárias.

Idade	N	%	Faixa etária	N	%
14 - 20	21	12,1	≤ 30 anos	93	53,8
21 - 30	72	41,6			
31 - 40	52	30,1			
41 - 54	28	16,2	> 30 anos	80	46,2
Total	173	100	Total	173	100

TABELA 2. Distribuição da amostra de acordo com as faixas etárias (de 14 a 54 anos) e os graus de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC).

Idade	NIC I		NIC II		NIC III		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
14 - 20	14	19,7	6	14	1	1,7	21	12,1
21 - 30	33	46,5	20	46,5	19	32,2	72	41,6
31 - 40	19	26,8	8	18,6	25	42,4	52	30,1
41 - 54	5	7	9	20,9	14	23,7	28	16,2
Total	71	100	43	100	59	100	173	100

TABELA 3. Distribuição da amostra de acordo com as faixas etárias (≤ 30 e > 30 anos) e os graus de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC).

Idade	NIC I		NIC II		NIC III		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
≤ 30 anos	47	66,2	26	60,5	20	33,9	93	53,8
> 30 anos	24	33,8	17	39,5	39	66,1	80	46,2
	71	100	43	100	59	100	173	100

TABELA 4. Distribuição da amostra de acordo com as faixas etárias (de 14 a 54 anos) e a presença de HPV.

Idade	IDADE X HPV				Total
	HPV +		HPV -		
	N	%	N	%	
14 - 20	2	6,7	19	13,3	21
21 - 30	14	46,7	56	39,1	70
31 - 40	11	36,6	44	30,8	53
41 - 52	3	10,0	24	16,8	27
Total	30	17,3	143	82,7	173

TABELA 5. Distribuição da amostra de acordo com as faixas etárias (≤ 30 e > 30 anos) e a presença de HPV.

IDADE		HPV +	HPV -	T	p
		N	N		
	≤ 30 anos	16	75	93	0,929
	> 30 anos	14	68	80	

TABELA 6. Distribuição da amostra de acordo com a presença de HPV e os graus de NIC.

NIC		HPV +	HPV -	T	p
		N	N		
	NIC I	6	65	70	Referência
	NIC II	15	28	43	0,0004 *
	NIC III	9	50	59	0,22
	NIC II/III	24	78	102	0,009 *

* Significado estatístico.

TABELA 7. Distribuição da amostra de acordo com a idade (14 a 54 anos) e a positividade de Ki-67.

Idade	Ki-67 +		Ki-67 -		Total
	N	%	N	%	
14 - 20	19	13,7	2	5,9	21
21 - 30	57	41,0	15	44,1	72
31 - 40	41	29,5	11	32,4	52
41 - 52	22	15,8	6	17,6	28
Total	139	80,3	34	19,7	173

TABELA 8. Distribuição da amostra de acordo com a idade (≤ 30 e > 30 anos) e a positividade de Ki-67.

Idade	Ki-67 +		Ki-67 -		Total
	N	%	N	%	
≤ 30 anos	76	54,7	17	50,0	93
> 30 anos	63	45,3	17	50,0	80
Total	139	100	34	100	173

TABELA 9. Distribuição da amostra de acordo com a positividade de Ki-67 e NIC.

Idade	NIC I		NIC II		NIC III	
	N	%	N	%	N	%
Ki-67 +	56	78,9	37	86,0	46	78,0
Ki-67 -	15	21,1	6	14,0	13	22,0
Total	71		43		59	173

TABELA 10. Distribuição da amostra de acordo com a idade (≤ 30 e > 30 anos) e a positividade de Ki-67.

Idade	NIC I		NIC II		NIC III	
	Ki-67 +	Ki-67 -	Ki-67 +	Ki-67 -	Ki-67 +	Ki-67 -
14 - 20	14	0	5	1	0	1
21 - 30	23	10	18	2	16	3
31 - 40	16	3	6	2	19	6
41 - 52	3	2	8	1	11	3
Total	56	15	37	6	46	13

TABELA 11. Distribuição da amostra de acordo com a idade (≤ 30 e > 30 anos) e a positividade de Ki-67 nos três graus de NIC.

Idade	NIC I			NIC II			NIC III		
	Ki-67 +	Ki-67 -	<i>p</i>	Ki-67 +	Ki-67 -	<i>p</i>	Ki-67 +	Ki-67 -	<i>p</i>
≤ 30 anos	37	10	1,0	23	3	0,666	16	4	1,0
> 30 anos	19	5		14	3		30	9	

TABELA 12. Distribuição da amostra de acordo com presença de HPV e a positividade de Ki-67.

Marcador		HPV +	HPV -	T	<i>p</i>
		N	N		
Ki-67	Positivo	30 (100%)	0	30	0,00*
	Negativo	0	143 (100%)	143	

TABELA 13. Distribuição da amostra de acordo com presença de HPV e a positividade de Ki-67, considerando o LI em quartis(Q).

Ki-67	HPV +		HPV -		T	p
	N	%	N	%		
Q I	0	0,0	34	23,8	34	Referência
Q II	1	3,3	11	7,7	12	0,08
Q III	9	30,0	46	32,1	55	0,012
Q IV	15	50,0	40	28,0	55	0,0008*
Q V	5	16,7	12	8,4	17	0,0008*
Total	30		143		173	

Ki-67	HPV +		HPV -		p	Total
	N	%	N	%		
QI	0	0,0	34	23,8	0,0002*	34
QIV/QV	20	66,7	53	37,1		73

Q1= < 10% **Q2** = 10-25%; **Q3**= 26-50%; **Q4** = 51-75%; **Q5**= > 75%

TABELA 14. Distribuição da amostra de acordo com a idade (14 a 54 anos) e a positividade de MYC.

Idade	MYC +		MYC -		Total
	N	%	N	%	
14 - 20	16	14,8	5	7,7	21
21 - 30	46	42,6	26	40,0	72
31 - 40	33	30,6	19	29,2	52
41 - 52	13	12,0	15	23,1	28
Total	108	100	65	100	173

TABELA 15. Distribuição da amostra de acordo com a idade (≤ 30 e > 30 anos) e a positividade de MYC.

Idade	MYC +		MYC -		Total
	N	%	N	%	
≤ 30 anos	62	57,4	31	47,7	93
> 30 anos	46	42,6	34	52,3	80
Total	108	100	65	100	173

TABELA 16. Distribuição da amostra de acordo com a positividade de MYC e NIC.

Idade	NIC I		NIC II		NIC III	
	N	%	N	%	N	%
MYC +	46	64,8	28	65,1	34	57,6
MYC -	25	35,2	15	34,9	25	42,4
Total	71	100	43	100	59	173

TABELA 17. Distribuição da amostra de acordo com a idade (≤ 30 e > 30 anos) e a positividade de MYC.

Idade	NIC I		NIC II		NIC III	
	MYC +	MYC -	MYC +	MYC -	MYC +	MYC -
14 - 20	12	2	4	2	0	1
21 - 30	17	16	16	4	13	6
31 - 40	15	4	3	5	15	10
41 - 52	2	3	5	4	6	8
Total	46	25	28	15	34	25

TABELA 18. Distribuição da amostra de acordo com a idade (≤ 30 e > 30 anos) e a positividade de MYC nos três graus de NIC.

Idade	NIC I		<i>p</i>	NIC II		<i>p</i>	NIC III		<i>p</i>
	MYC +	MYC -		MYC +	MYC -		MYC +	MYC -	
≤ 30 anos	29	18	0,446	20	6	0,044*	13	7	0,411
> 30 anos	17	7		8	9		21	18	
Total	46	25		28	15		34	25	

TABELA 19. Distribuição da amostra de acordo com presença de HPV e a positividade de Ki-67.

MYC		HPV +	HPV -	T	<i>p</i>
		N	N		
MYC	Positivo	25	82	107	0,007*
	Negativo	5	61	66	

TABELA 20. Distribuição da amostra de acordo com presença de HPV e a positividade de MYC, considerando o LI em quartis(Q).

MYC	HPV +		HPV -		T	<i>p</i>
	N	%	N	%		
Q I	5	16,7	61	42,6	66	Referência
Q II	0	0,0	5	3,4	5	
Q III	0	0,0	7	4,9	7	0,45
Q IV	7	23,3	23	16,1	30	0,030*
Q V	12	40,0	36	25,0	48	0,009*
Q VI	6	20,0	11	8,0	17	0,002*
Total	30	100	143	100	173	

MYC	HPV +		HPV -		<i>p</i>	Total
	N	%	N	%		
QI	5	16,7	61	46,6		66
QIV/QVI	25	83,3	70	53,4	0,003*	95
Total	30	100	131	100		

Q1= < 5% **Q2** = 5- 10%; **Q3**= 11 – 25%; **Q4** = 26 – 50%; **Q5** = 51 – 75%; **Q6**= > 75%

APÊNDICE 5 – GRÁFICOS COMPLEMENTARES

GRÁFICO 1. Distribuição da amostra de acordo com a faixa etária (N=173).

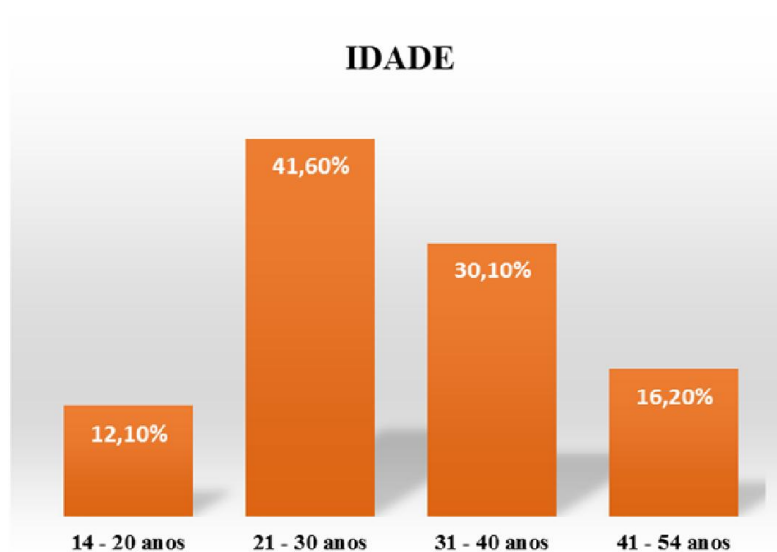


GRÁFICO 2. Distribuição da amostra de acordo com os grupos etários.

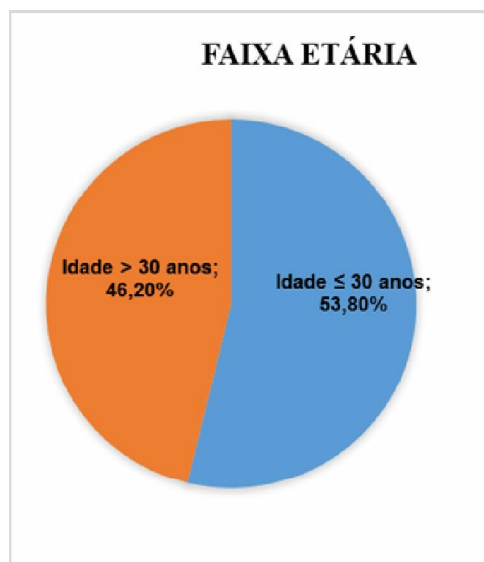


GRÁFICO 3. Distribuição da amostra de acordo com a faixa etária nos graus de NIC.

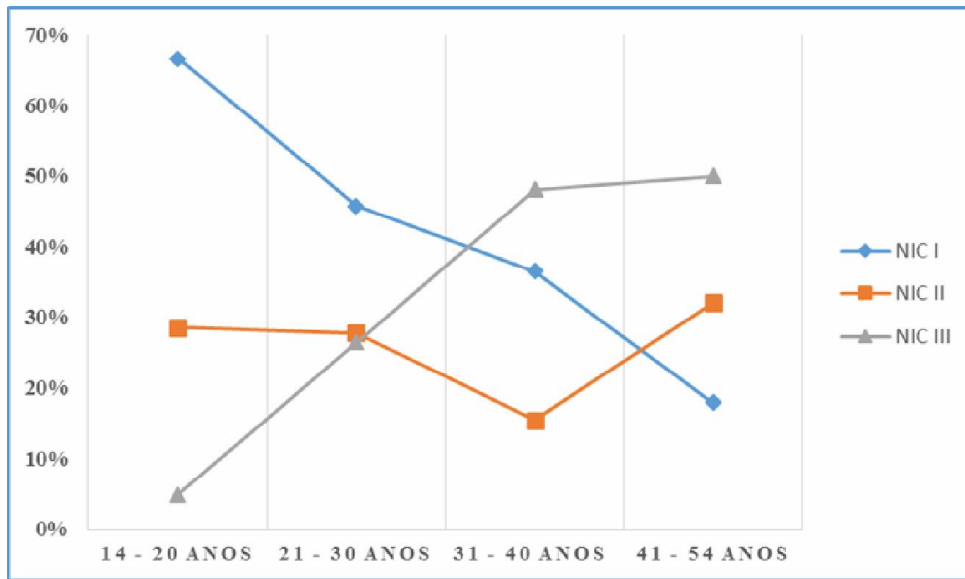


GRÁFICO 4. Distribuição da amostra de acordo com grupos etários nos graus de NIC.

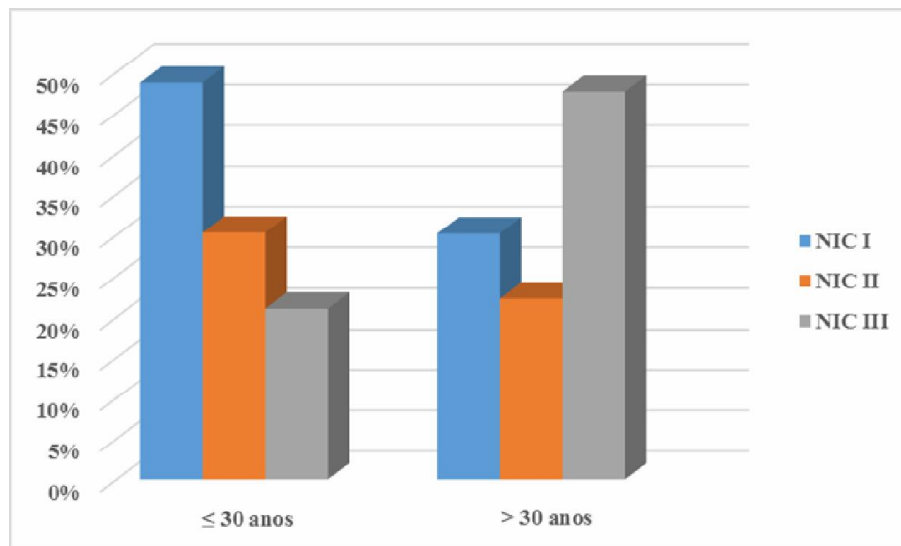


GRÁFICO 5. Distribuição da amostra de acordo com NIC.

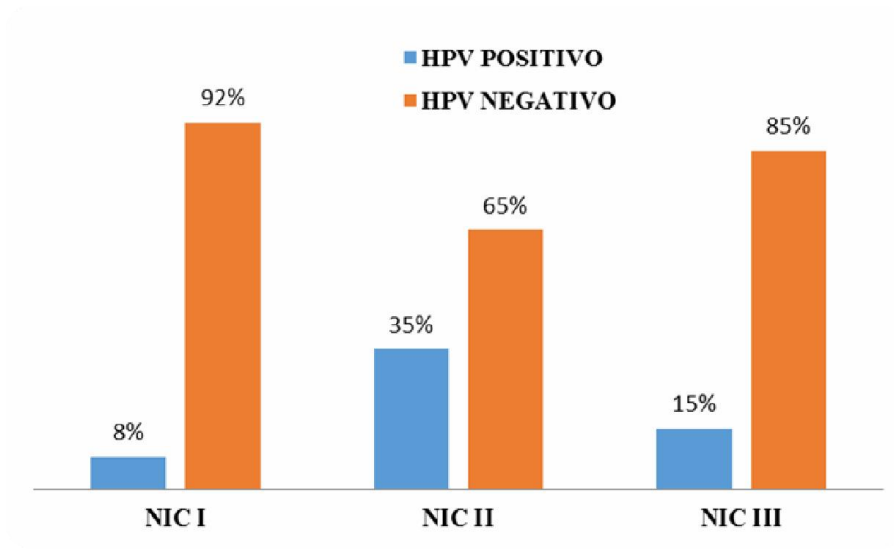


GRÁFICO 6. Distribuição da amostra de acordo nas faixas etárias e a presença de HPV.

